UNIVERSITE RENE DESCARTES DE PARIS

UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DE BIOLOGIE HUMAINE ET EXPÉRIMENTALE

Année: 1972_1973 Série E.N° 272

THESE

présentée à

L'unité d'enseignement et de recherche de biologie humaine
et expérimentale de l'université René Descartes de Paris.

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'État)

par

Lucien BENICHOU

ETUDE DES GAZ PRODUITS PAR LES BACTERIES ANAEROBIES AGENTS DE GANGRENES GAZEUSES CULTIVEES EN MILIEU AU THIOGLYCOLATE DE SODIUM SOUS VIDE APRES ALCALINISATION DU MILIEU EN FIN DE CULTURE

soutenue le 1 Juin 1973

JURY: M.J. BORY Président
M.G. LE MOAN Examinateurs
M.G. LELUAN
M.A.R. PREVOT

UNIVERSITE RENE DESCARTES DE PARIS

UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DE BIOLOGIE HUMAINE ET EXPÉRIMENTALE

Année: 1972_1973 Série E.N° 272

THESE

présentée à

L'unité d'enseignement et de recherche de biologie humaine
et expérimentale de l'université René Descartes de Paris.

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'État)

par

Lucien BENICHOU

ETUDE DES GAZ PRODUITS PAR LES BACTERIES ANAEROBIES AGENTS DE GANGRENES GAZEUSES CULTIVEES EN MILIEU AU THIOGLYCOLATE DE SODIUM SOUS VIDE APRES ALCALINISATION DU MILIEU EN FIN DE CULTURE

soutenue le 1 Juin 1973

JURY: M.J. BORY Président
M.G. LE MOAN Examinateurs
M.G. LELUAN
M.A.R. PREVOT

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A ma femme,

A mon fils,

A mes parents,

A ma grand-mère,

A mes beaux-parents,

A mon frère,

A ma soeur,

A mes beaux-frères et belles-soeurs,

A toute ma famille,

A tous mes amis.

En témoignage de ma profonde affection.

À ma femme,

À mon fils,

À mes parents,

À ma grand-mère,

À mes beaux-parents,

À mon frère,

À ma sœur,

À mes beaux-frères et belles-sœurs,

À toute ma famille,

À tous mes amis.

En témoignage de ma profonde affection.

A Monsieur le Professeur A.R.PREVOT

Membre de l'Académie des Sciences,
Membre de l'Académie de Médecine,
Chef de Service Honoraire de l'Institut Pasteur de Paris.

Qui nous a fait le grand honneur d'examiner ce travail et a bien voulu accepter de faire partie du Jury de cette thèse.

Qu'il veuille trouver ici l'expression de notre respect et de notre profonde admiration.

A Monsieur le Professeur A.R.PREVOT

Membre de l'Académie des Sciences,
Membre de l'Académie de Médecine,
Chef de Service Honoraire de l'Institut Pasteur de Paris.

Qui nous a fait le grand honneur d'examiner
ce travail et a bien voulu accepter de faire
partie du Jury de cette thèse.

Qu'il veuille trouver ici l'expression de
notre respect et de notre profonde admiration.

A Monsieur le Professeur J.BORY

Professeur de Microbiologie à l'Université René Descartes
Chef de Laboratoire des Hôpitaux de Paris

Qui a bien voulu nous confier ce travail
et nous a prodigué les conseils nécessaires
à sa réalisation.

Il nous a fait l'honneur d'accepter de présider
le Jury de cette thèse.

Qu'il soit assuré de notre attachement
et de notre respectueux dévouement.

A Monsieur le Professeur G.LE MOAN

Professeur de Toxicologie à l'Université René Descartes
Pharmacien des Hôpitaux de Paris

Qui nous a fait l'honneur de s'intéresser
à ce travail et a accepté de le juger,

Qu'il trouve ici l'expression de notre
profonde gratitude.

A Monsieur G.LELUAN

Maître de Conférences Agrégé de Microbiologie
Pharmacien-Chef des Hôpitaux de Paris

Qui nous a permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions en nous accueillant comme Interne puis comme Attaché dans son service hospitalier.

Ses encouragements, ses conseils et sa collaboration nous ont été très précieux.

Que ce travail soit le témoignage de notre profonde et très sincère reconnaissance.

A Mademoiselle le Professeur S.LAMBIN

Professeur Honoraire de Microbiologie à la Faculté de Pharmacie de Paris

Membre de l'Académie de Pharmacie

Qui nous a accueilli avec la plus grande bienveillance comme Assistant au Laboratoire du Certificat d'Immunologie et de Bactériologie.

Qu'elle veuille être assurée de notre respectueuse gratitude.

A Mademoiselle C.LABARRE

Maître Assistant de Microbiologie

dont les travaux ont contribué à l'élaboration de notre thèse,

Qu'elle en soit ici profondément remerciée.

I N T R O D U C T I O N

La difficulté que représente la manipulation des gaz n'a pas permis pendant longtemps leur étude précise mais depuis le début du siècle de nombreux perfectionnements ont été apportés à l'analyse des mélanges gazeux.

Les phénomènes d'absorption dans le visible, l'ultra-violet et l'infra-rouge, les propriétés magnétiques de certains gaz ont été ainsi mis à profit comme procédés physiques d'analyse. Reprenant l'étude des gaz produits par certaines bactéries anaérobies, agents des gangrènes gazeuses, nous avons utilisé de nouvelles techniques très sensibles telles que la chromatographie en phase gazeuse et cette même méthode couplée à la spectrométrie de masse.

Après un rapide historique des bactéries anaérobies nous exposerons :

- Dans un premier chapitre :

Les travaux effectués par différents auteurs qui ont utilisé la chromatographie en phase gazeuse dans le domaine de la microbiologie.

- Dans un deuxième chapitre :

Les différentes techniques que nous avons utilisées : culture, prélèvement des gaz, chromatographie en phase gazeuse, couplage de cette méthode avec la spectrométrie de masse et spectrométrie de masse proprement dite.

- Dans un troisième chapitre :

Les résultats obtenus pour les 11 souches étudiées.

- Dans un quatrième chapitre :

Une étude comparative des différents résultats obtenus.

- Dans un cinquième chapitre

Les relations entre les métabolites identifiés et le métabolisme des bactéries anaérobies.

H I S T O R I Q U E

En 1861, P A S T E U R identifie l'agent de la fermentation butyrique et lui donne le nom de vibrion, organisme bien distinct des levures et des ferments lactiques. Il constate en outre que des vibrions butyriques, aujourd'hui Clostridium butyricum, sont rapidement immobilisés et tués par l'oxygène et découvre ainsi l'anaérobiose qu'il définit comme "la vie sans air".

En 1877, PASTEUR et JOUBERT(76,77)découvrent le premier germe anaérobie pathogène, agent de gangrène et septicémie : le vibrion septique. L'effet néfaste de ces microorganismes avait d'ailleurs fait l'objet de nombreuses observations. Ainsi Ambroise PARE, décrivait "ces plaies grandement puantes et pleines de vers avec gangrène et pourriture" et LARREY prescrivait des amputations larges chez les porteurs de plaies souillées.

RENAULT (90) en 1840 avait déjà mentionné la production de gaz dans les gangrènes traumatiques des animaux domestiques.

En 1884, CHAUVEAU (30) retrouve un vibrion analogue à celui décrit par PASTEUR dans la gangrène gazeuse qu'on appelait alors l'oedème malin. Cette même année BIENSTOCK (11) découvre le Bacillus putrificus.

En 1893, WELCH et NUTTAL (109) isolent un anaérobie qu'en 1898 VEILLON et ZUBER (101) dénomment Bacillus perfringens.

En 1902, TISSIER et MARTELLY (97) isolent, à partir d'une viande, le Bacillus bifermentans et en 1908, METCHNIKOFF (66) découvre le Bacillus sporogenes en étudiant la flore intestinale.

C'est pendant la guerre de 1914-1918 que les nombreux cas de gangrène gazeuse observés chez les blessés font reprendre l'étude des anaérobies par WEINBERG et SEGUIN (106,107,108). Aux anaérobies connus viennent s'ajouter : Bacillus oedematiens, Bacillus fallax, Bacillus histolyticus et Bacillus aerofoetidus.

Tous ces travaux devaient conduire les bactériologistes à étudier également la production de gaz qui devenait ainsi un des éléments de différenciation de nombreuses espèces anaérobies. WOLF et HARRIS (110,111,112) sont les premiers en 1917 à établir une courbe de dégagement gazeux ainsi que la composition relative en hydrogène et anhydride carbonique du gaz produit par cinq espèces anaérobies.

Ces études ont été poursuivies sur d'autres espèces par d'autres auteurs comme PREVOT (79,80,81,82), WEINBERG, NATIVELLE (105) et KAYSER (86). La production d'hydrogène sulfuré a été également largement étudiée par MYERS (72) et KAHN (48) mais ce composé ne suffit pas à expliquer l'odeur nauséabonde des gaz dégagés par les bactéries anaérobies.

GUGGENHEIM en 1933 (43) relève dans le milieu de culture la présence d'autres catabolites odorants comme le scatole, l'indole et les amines de décarboxylation. Certaines amines de décarboxylation ont été identifiées par chromatographie sur papier et électrophorèse par SARRAF et PREVOT (92) selon la technique de BLASS (15,16).

BILLY (12,13,14) également en 1962, reprenant les techniques utilisées par les précédents auteurs, met en évidence la présence de tryptamine, de putrescine, de tyramine, d'histamine et de butylamine et fait remarquer l'influence du milieu de culture sur les odeurs des gaz dégagés par les bactéries anaérobies.

J.BORY (22,23,25,29) et C.LABARRE (53,54,55,57,58,59) déterminent, en 1968, pour 11 bactéries anaérobies telluriques, puis en 1972, pour Clostridium botulinum (21) et pour Plectridium tetani (56), la courbe représentant l'évolution du dégagement gazeux en fonction du temps et mesurent le volume total des gaz en étudiant leur composition par l'analyse sur la cuve à mercure et la spectrométrie de masse.

Poursuivant les travaux de J.BORY et C.LABARRE, nous avons modifié les conditions opératoires de prélèvement afin d'obtenir un mélange gazeux de composition différente et utilisé de nouvelles méthodes d'analyse telles que la chromatographie en phase gazeuse et cette même méthode couplée à la spectrométrie de masse.

C H A P I T R E I

TRAVAUX ANTERIEURS

Avant d'exposer nos travaux personnels, nous citerons les travaux des auteurs qui ont particulièrement utilisé la chromatographie en phase gazeuse durant ces dix dernières années dans le domaine de la microbiologie.

CHERRY et MOSS (31) ont bien souligné l'importance prise par la chromatographie en phase gazeuse dans le laboratoire de microbiologie depuis les premiers travaux de JAMES et MARTIN en 1952 sur la séparation des acides gras aliphatiques.

Les principaux travaux peuvent être classés en différents chapitres :

- travaux effectués sur les corps bactériens,
- travaux effectués sur le milieu de culture sans séparation préalable des bactéries,
- travaux effectués sur le milieu de culture après séparation des bactéries,
- travaux effectués sur "l'espace de tête" du milieu de culture,
- travaux effectués en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

1) Travaux effectués sur les corps bactériens

ABEL et DESCHMERTZING (1) sont les premiers en 1963 à séparer, par chromatographie en phase gazeuse, les acides gras des corps bactériens appartenant à 11 espèces et leurs travaux leur permettent de supposer qu'une séparation parallèle des amino-acides et des sucres des bactéries pourrait être un moyen pratique de classification des bactéries.

En 1964 YAMAKAWA et UETA (114) étudient la composition en hydrates de carbone et acides gras de différentes espèces de Neisseriacées.

Par la suite, KANEDA (49,50), LEWIS (62), MOSS (70,71) et FARSHTCHI (36) ont également étudié les acides gras de diverses espèces bactériennes.

OYAMA (75) préconise le premier une pyrolyse des bactéries pour établir une taxinomie mais c'est REINER (87,88,89), en même temps que GARNER et GENNARO (38), qui applique cette méthode de pyrolyse à l'identification de quelques microorganismes. REINER pense alors que ce procédé peut servir de base à une taxinomie bactérienne, les enregistrements semblant être caractéristiques des microorganismes étudiés. FONTANGES, BLANDENET et QUEIGNEC (37) font cependant remarquer qu'une même préparation bactérienne, pyrolysée à quelques heures d'intervalle, conduit à des enregistrements où la hauteur relative des pics peut être différente. L'état de leurs travaux fait apparaître que, si l'identification de certains microorganismes comme les mycobactéries paraît possible, dans la majorité des cas il n'est pas encore possible d'envisager une taxinomie précise à l'aide de ce procédé.

2) Travaux effectués sur le milieu de culture sans séparation préalable des bactéries.

MOORE, CATO et HOLDEMAN (69) en 1966 ont étudié les produits de fermentation de plusieurs espèces de Clostridium. Les cultures sont faites sur quatre types de milieux bien définis et, après trois semaines d'incubation, sont acidifiées puis extraites par l'éther. La chromatographie en phase gazeuse est opérée à 110º avec du "Resolflex" comme phase stationnaire et un détecteur à conductibilité thermique. Les acides volatils sont identifiés par comparaison avec des composés standards connus contrairement aux alcools pour lesquels les auteurs ont admis une possibilité d'interférence avec les cétones et les aldéhydes dans les conditions opératoires utilisées.

HENIS, GOULD et ALEXANDER (45,46) ont également fait des extractions à l'éther à partir de milieux de culture de bactéries aérobies telles que le bacille Pyocyanique, le Colibacille, l'Aerobacter et différentes espèces de Streptomyces. La séparation sur colonne comportant du "Polyethylène glycol" comme phase stationnaire a permis à ces auteurs d'obtenir des chromatogrammes caractéristiques pour chaque type de germes, mais ils n'ont pas pu identifier la majorité des composés séparés qu'ils ont représentés par des lettres dans leur étude comparative.

Par ailleurs, utilisant un détecteur à ionisation de flamme et un détecteur à capture d'électrons, ces auteurs ont constaté comme SHILMAN (94) et MITRUKA (67,68) la supériorité de ce dernier type de détecteur pour des substances telles que l'acétoïne et le diacétyle. L'absence de ces deux substances sur nos chromatogrammes pourrait être expliquée par l'utilisation d'un appareil ne comportant qu'un détecteur à ionisation de flamme.

Après les travaux de PREVOT (83,84,85), SARRAF (92) et BILLY (12) utilisant des méthodes conventionnelles, BROOKS et MOORE (26) en 1969 ont repris l'étude des métabolites des Clostridium et plus particulièrement des amines par la chromatographie en phase gazeuse. Cette étude effectuée à l'aide d'une colonne de Silicone SE 30 leur a permis de diviser les espèces décrites en 10 groupes.

BROOKS, MOSS et DOWELL (27) ont ainsi établi une différence entre Clostridium bifermentans et Clostridium sordellii, ce dernier étant considéré souvent comme un variant toxigénique du premier. Selon ces auteurs, seul Clostridium bifermentans produit de la β phénylalanine et de la tryptamine.

GOLOVNYA, MIRONOV et ZHURAVLEVA (39,40,41) ont, pour leur part, identifié 21 amines avec une colonne de polyéthylène glycol après distillation et entraînement à la vapeur d'eau d'une culture de Streptococcus lactis.

3) Travaux effectués sur le milieu de culture après séparation des bactéries.

En 1967, LEWIS et MOSS (61), utilisant une technique de distillation du milieu de culture, ont étudié la production d'acides volatils pour 15 espèces de Clostridium. Les vapeurs ont été recueillies dans un bain de glace avec 25ml de soude à 5 p.100; après évaporation les sels sont dissous dans de l'acide chlorhydrique 6N et les acides libérés sont extraits par un mélange éther-hexane-acétone. La séparation a été faite sur une colonne d'adipate d'éthylène glycol. L'acide acétique a été retrouvé pour 14 espèces sauf pour Clostridium butyricum, les acides propionique, isobutyrique, butyrique et isovalérique ont été retrouvés pour les 15 espèces, mais l'acide isocaproïque n'est apparu que dans les extractions des milieux de culture de Clostridium bifermentans, sordellii et difficile.

TURNER et GILMOUR (100) ont analysé lesproduits de la fermentation de Clostridium butylicum en utilisant la chromatographie en phase gazeuse en comparaison avec les méthodes conventionnelles. Ils ont injecté 5µl de fraction neutre de la distillation de Duclaux (distillation effectuée à pH 3) (35) dans une colonne d'Hallcomid. La détection par ionisation de flamme a révélé la présence d'acétone, éthanol et n.butanol. L'identification a été faite par comparaison des temps de rétention avec ceux de substances pures. La concentration a été déterminée par la mesure de la surface des pics. La présence d'isopropanol a été exclue pour deux raisons : d'une part les auteurs n'ont pas observé de pic sur le chromatogramme avec un temps de rétention identique à celui de l'isopropanol et d'autre part, ils n'ont pas constaté de différence significative dans le dosage de l'acétone de la fraction neutre avant et après oxydation par le bichromate de potassium (l'isopropanol dans cette dernière condition devant donner de l'acétone). TURNER et GILMOUR ont surtout insisté sur la rapidité et la précision de cette technique chromatographique qui ne nécessite que 5µl au lieu de 100cm^3 avec la technique conventionnelle.

DOELLE (34), à la suite de NEISH (73), a utilisé pour ses travaux sur Clostridium acetobutylicum et Zymomonas mobilis une technique mixte avec distillation du milieu puis extraction du résidu par l'éther. Il a pu identifier par chromatographie en phase gazeuse les mêmes métabolites que précédemment.

O'BRIEN (74), étudiant le catabolisme du glucose chez différentes bactéries, a pu mettre en évidence par chromatographie en phase gazeuse les produits suivants : éthanol, diacétyle, acétoïne, 2-3 butanediol et acide acétique. L'acétoïne a même été retrouvée pour des bactéries comme Escherichia coli et Pseudomonas maltophilia alors que l'analyse chimique ordinaire ne permettait pas de les classer parmi les bactéries productrices d'acétoïne. Son étude a été effectuée après extraction par l'éther du surnageant de culture acidifié à pH 1.

YOSHIOKA, KITAMURA et TAMURA (115) ont opté pour une méthode d'étude très rapide des métabolites du milieu de culture qui consiste à injecter directement, après centrifugation, le surnageant du milieu de culture dans une colonne contenant du Porapak comme phase stationnaire. Leurs travaux ont porté sur Bifidobacterium bifidum, Escherichia coli et de nombreux lactobacilles. Ils ont pu ainsi séparer 11 métabolites mais leur technique qui a l'avantage de la simplicité et de la rapidité, ne permet pas une bonne reproductibilité et impose un changement de colonne toutes les 3o injections.

4) Travaux effectués sur "l'espace de tête" du milieu de culture des bactéries.

BASSETTE, BAWDON, CLAYDON et TOAN (4, 5, 6, 7, 98) ont, de leur côté, utilisé la chromatographie en phase gazeuse pour l'étude de substances volatiles produites dans le lait par différentes bactéries. Le prélèvement s'effectue selon la technique des "espaces de tête" (6, 51) : le milieu de culture est contenu dans un flacon obturé par un bouchon en caoutchouc, l'aiguille d'une seringue à gaz est introduite à travers ce bouchon et 1ml d' "espace de tête" est aspiré dans la seringue puis injecté dans le chromatographe. Ils ont pu ainsi mettre en évidence, à partir de nombreuses espèces bactériennes, 4 métabolites dans les différents chromatogrammes obtenus : l'acétaldéhyde, l'éthanol, le méthane-thiol et le diacétyle.

5) Travaux effectués en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

Cette technique n'est pas encore très répandue dans les laboratoires de microbiologie. A notre connaissance seuls BALLIO, BARCELLONNA et SALVATORI (3) ont utilisé cette méthode qui leur a permis d'identifier l'acide 9-10 méthylène hexadecanoïque dans certaines espèces d'Actinomycetales.

CHAPITRE II

TECHNIQUES

Nous décrirons les techniques que nous avons utilisées pour la culture des bactéries, le prélèvement des gaz et l'analyse de ces gaz. En ce qui concerne l'analyse des gaz, nous décrirons la chromatographie en phase gazeuse, le couplage de cette méthode avec la spectrométrie de masse et la spectrométrie de masse proprement dite.

I- CULTURE

Nous avons utilisé des Erlenmeyer de 250cm^3 (24) (Fig. 1) spécialement conçus pour la culture des bactéries anaérobies et le recueil des gaz. Cette fiole A possède un rodage mâle sur lequel vient s'adapter à sa partie supérieure une pièce B munie d'un robinet (R_1) et d'un rodage mâle permettant la liaison avec une trompe à vide.

Nous avons fixé sur cet Erlenmeyer un ajutage latéral muni d'un robinet pour permettre l'addition de soude sans entrée d'air.

Cet Erlenmeyer est destiné à contenir 50 cm^3 d'un milieu de culture bien défini. Pour tous nos essais nous avons utilisé un milieu de culture préparé à partir de substances appartenant aux mêmes lots de fabrication. Nous avons pu ainsi effectuer une étude véritablement comparative de 11 bacilles anaérobies.

- Composition et préparation du milieu de culture

- Peptone pancréatique (Trypticase)	15g
- Extrait hydrosoluble de levure	5g
- Chlorure de sodium	2,5g
- Gélose	0,75g
- Eau distillée	q.s.p. 1000 ml

Les divers composants sont dissous dans l'eau distillée, le pH est ajusté à 7,2-7,3 et le milieu est stérilisé à l'autoclave à 120ºC pendant 30 minutes. Puis nous ajoutons :

- Glucose	5g
- Thioglycolate de sodium	0,5 g

Après dissolution, le milieu est réparti à raison de 50 cm^3 par Erlenmeyer et stérilisé à l'autoclave à 110ºC pendant 30 minutes. Pour la bonne marche de la stérilisation, la partie supérieure de l'Erlenmeyer est bouchée par un tampon de coton cardé, le robinet étant maintenu en position ouverte. Les milieux sont ensemencés après refroidissement, à l'aide d'une pipette Pasteur, en soulevant aseptiquement la partie supérieure rodée.

Nos ensemencements ont été effectués avec des souches fournies par A.R.PREVOT, Directeur du Service des anaérobies de l'Institut Pasteur de Paris. Elles ont été entretenues en bouillon viande foie glucosé, en ampoules scellées sous vide. Leur pouvoir toxinogène a été vérifié (53) par inoculation sous-cutanée au cobaye du filtrat de culture.

Nous avons ensemencé chaque Erlenmeyer à raison de X gouttes - à l'aide d'une pipette Pasteur - d'une culture en bouillon viande foie glucosé âgée de 24 heures.

Le vide est ensuite réalisé à l'aide d'une trompe à eau jusqu'à arrêt de l'ébullition apparente. Après avoir fermé le robinet supérieur et débranché la trompe, l'Erlenmeyer est placé à l'étuve à 37ºC.

Après 5 jours de culture nous ajoutons par l'ajutage latéral 20cm^3 de soude 5N et nous recueillons les gaz.

Après l'extraction des gaz, nous vérifions la pureté de la culture après étalement d'une goutte de milieu et coloration par la méthode de Gram.

II- PRELEVEMENT DES GAZ

Nous avons tout d'abord effectué les prélèvements des gaz à partir de l'Erlenmeyer précédemment décrit à l'aide d'une trompe à chute de mercure, type Sprengel (42).

L'adjonction d'un système de remontée de mercure permet une utilisation plus facile de cette trompe mais malheureusement elle ne le rend pas tout à fait automatique car de nombreux réglages doivent s'effectuer durant la manipulation.

Pour éviter cet inconvénient et un temps de recueil très long, nous avons conçu, en nous inspirant de l'appareil à réserve alcaline de VAN SLYKE, une trompe à mercure (Fig. 1) dont nous décrirons la structure et le fonctionnement.

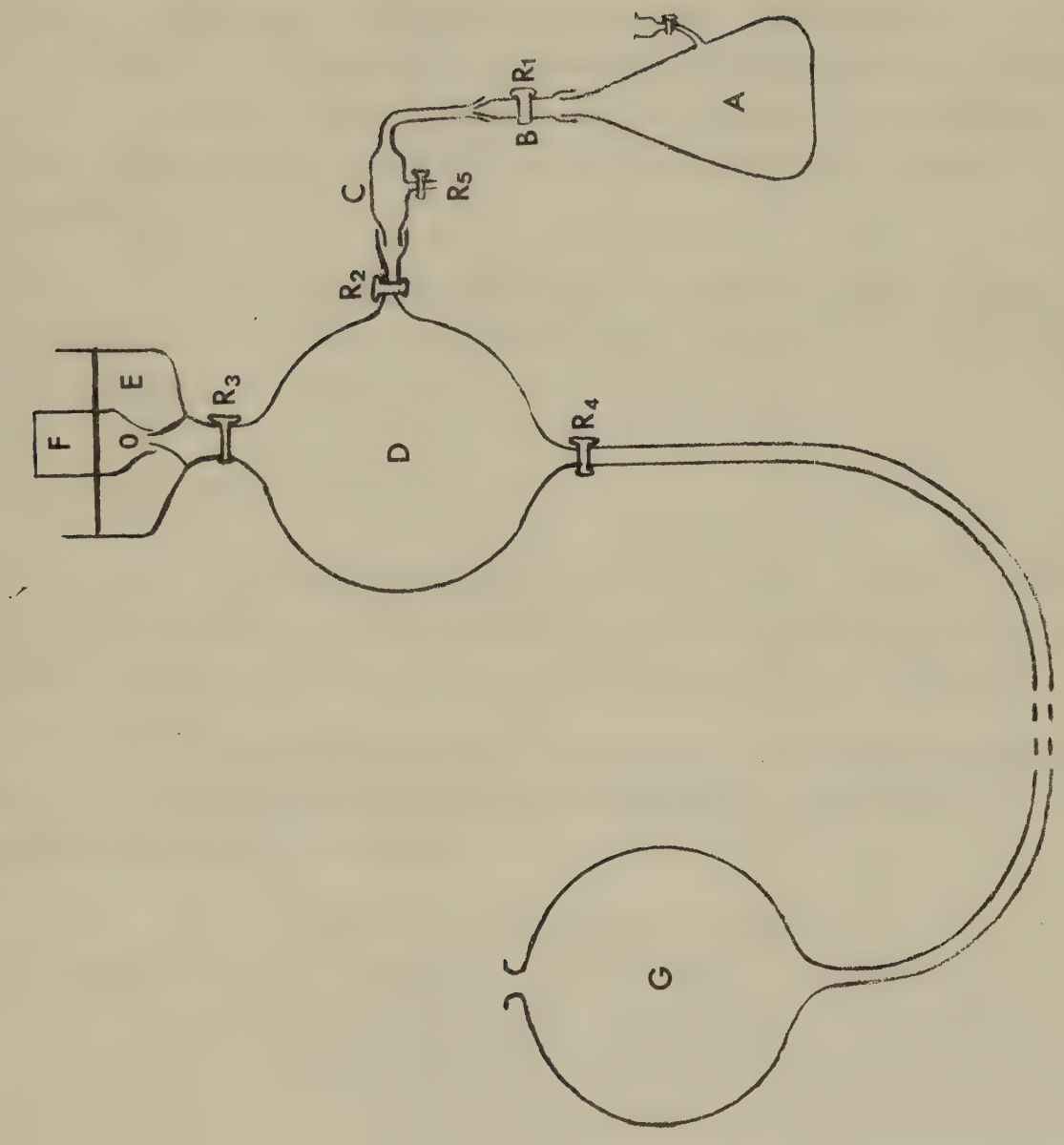


Figure 1 - Appareil à prélèvement des gaz

A/ Description de l'appareil

Cet appareil en verre pyrex comporte :

a) Une partie fixe

- l'ampoule D ($300 cm^3$) est surmontée d'une cuve E à la base de laquelle se trouve un ajutage O en relation avec l'ampoule D. Cet ajutage est légèrement surélevé pour permettre une introduction plus sûre des gaz dans le récipient F destiné à les recevoir. Le passage des gaz de l'ampoule D au récipient F est commandé par le robinet 3.

- l'ampoule D possède une courte tubulure latérale commandée par le robinet 2. Cette même ampoule D peut être fermée à sa base par le robinet 4.

b) Une partie mobile

- l'ampoule G ($400 cm^3$) est en relation avec l'élément D par l'intermédiaire d'une tubulure en caoutchouc qui permet de faire descendre le mercure jusqu'à la base de cet élément D.

- les positions des éléments D et G sont calculées pour que dans les conditions normales de pression atmosphérique, le mercure affleure le robinet 4 .

- le compartiment C ($25 cm^3$) représente le dispositif intermédiaire qui se branche sur la tubulure latérale de l'ampoule D pour la mettre en relation avec l'Erlenmeyer A ($250 cm^3$). Ce dernier possède, rappelons-le, une partie supérieure B rodée. Le rodage mâle du compartiment C, qui va s'adapter à l'ampoule D, est suffisamment large pour permettre l'introduction d'une nacelle contenant un produit déshydratant, le chlorure de calcium, destiné à absorber la vapeur d'eau, contenue dans les gaz.

Sur ce compartiment C une petite tubulure latérale, munie du robinet 5, permet de réaliser un vide primaire par l'intermédiaire d'une trompe à eau.

B/ Fonctionnement de l'appareil

a) Elimination de l'air contenu dans l'appareil

Dans un premier temps, les niveaux de mercure sont équilibrés dans l'ampoule G et la cuve E, les robinets 3 et 4 étant ouverts et le robinet 2 étant fermé. Afin de réaliser le vide dans l'élément D, le robinet 3 est fermé et l'ampoule G est abaissée de telle façon que le niveau du mercure affleure le robinet 4.

Un vide primaire est obtenu dans le compartiment C à l'aide d'une trompe à eau, par l'intermédiaire du robinet 5 qui sera fermé après l'opération. Ensuite, le robinet 2 est ouvert et, après un temps d'équilibre entre l'ampoule D et le compartiment C, ce robinet 2 est à nouveau fermé. On fait alors remonter le mercure dans l'ampoule D jusqu'à la cuve E. L'air recueilli au cours de cette opération est évacué par ouverture du robinet 3. Le résidu d'air du compartiment C, dans lequel on avait réalisé un vide primaire, est épuisé par trois opérations identiques. Une dernière opération, sans ouverture du robinet 3, permet d'entendre le mercure "claquer" lorsqu'il arrive au niveau de la partie supérieure de D.

b) Extraction des gaz

Le vide étant réalisé dans l'ampoule D et le compartiment C, et le mercure se trouvant au niveau du robinet 4, on ouvre les robinets 1 et 2. Un équilibre gazeux s'installe entre l'ensemble DC et l'erlenmeyer A.

Le robinet 1 est alors fermé et on attend deux minutes pour permettre l'absorption de la vapeur d'eau par le déshydratant. Le

robinet 2 est ensuite fermé et on amène l'ampoule G au niveau de la cuve E. Le mercure remonte dans l'ampoule D emprisonnant une partie du gaz se trouvant primitivement dans l'Erlenmeyer.

Le flacon F, destiné à recueillir les gaz, est rempli de mercure, retourné et déposé au-dessus de l'orifice O recouvert par le mercure de la cuve E.

En ouvrant le robinet 3, le gaz présent dans l'ampoule D passera dans le flacon F. L'opération est alors renouvelée plusieurs fois jusqu'à épuisement total du gaz de l'Erlenmeyer A et du compartiment C. Lors de la dernière opération, le mercure doit "claquer" au niveau du robinet 3 afin de s'assurer que le recueil des gaz a été complet .

Le flacon F, contenant les gaz,est fermé dans la cuve à mercure E grâce à un bouchon en caoutchouc dont on assurera la fixation par une capsule en bakelite perforée en son centre. Bien que l'étanchéité de ce système soit satisfaisante, nous préférons conserver les flacons en position retournée avant l'analyse des gaz.

Ces gaz sont ensuite prélevés à travers le bouchon en caoutchouc,à l'aide d'une seringue à gaz de "type Hamilton", et injectés dans l'appareil de chromatographie en phase gazeuse.

III- CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Nous exposerons,tout d'abord rapidement,le principe général de cette technique dont on peut trouver les détails dans divers manuels (2 , 52 , 99) . Puis nous décrirons le schéma de fonctionnement et les différents éléments d'un appareil de chromatographie en phase gazeuse tout en signalant les caractéristiques du matériel que nous avons utilisé. Nous terminerons par l'exposé

du travail que nous avons effectué par cette méthode, c'est-à-dire la séparation, l'identification et l'évaluation quantitative des composés du mélange gazeux.

MARTIN et SYNGE ont été les premiers,vers 1941,à utiliser un gaz comme phase mobile dans une colonne contenant une phase liquide supportée par de la célite. Cette chromatographie gaz-liquide,ou chromatographie en phase gazeuse, n'a connu d'applications pratiques qu'en 1952 lorsque JAMES et MARTIN réussirent la première séparation d'acides gras aliphatiques. L'appareillage a été long à connaître une mise au point satisfaisante et ce n'est que vers 1960 que les appareils classiques sont apparus dans les laboratoires Cette technique a connu depuis de multiples applications qui se sont étendues au domaine de la microbiologie.

A/ Principe

La chromatographie en phase gazeuse est caractérisée essentiellement par une phase mobile,représentée par un gaz : le gaz vecteur. La phase stationnaire est soit un adsorbant, soit un liquide à point d'ébullition très élevé recouvrant un support inactif contenu dans une colonne. Lorsqu'une substance est introduite dans la colonne et portée à travers cette colonne par le gaz vecteur,il s'établit en chaque point un plateau d'équilibre entre la fraction retenue par la phase fixe et celle qui demeure dans la phase mobile. Le rapport de masse de ces deux fractions s'appelle "coefficient de partage". Les conditions opératoires n'étant pas modifiées, une autre substance,dont le coefficient de partage est différent,ne mettra pas le même temps pour parcourir la colonne. Si ces substances font partie d'un mélange, après passage dans une colonne appropriée,elles sortent à des moments différents,on dit que leur temps de rétention est différent. Une colonne à chromatographie en phase gazeuse peut donc être assimilée à une colonne à distiller, possédant un très grand nombre de plateaux,permettant les mêmes séparations que la colonne à chromatographie étudiée.

La température intervient dans le temps de rétention, en effet lorsque la température s'élève on note une diminution du temps de rétention d'une substance donnée. Donc une meilleure séparation est obtenue lorsqu'on travaille à des températures peu élevées mais les pics ont l'inconvénient de s'élargir.

Les différents paramètres de la chromatographie en phase gazeuse nécessitent de préciser trois types de chromatographie :

- la chromatographie isotherme et isobare : la température de la colonne et le débit du gaz vecteur ne varient pas durant toute la manipulation.
- la chromatographie à température programmée : le débit du gaz vecteur reste constant mais la température du four dans lequel se trouve la colonne varie d'une façon définie.
- la chromatographie à débit programmé : la température de la colonne reste constante mais le débit du gaz vecteur varie d'une façon définie.

Pour accélérer la durée des analyses et améliorer la résolution, la chromatographie programmée permet de faire varier les conditions opératoires de l'analyse. C'est surtout la chromatographie à température programmée qui s'est développée, grâce à un appareillage maintenant courant sur tous les appareils de chromatographie en phase gazeuse, et qui réalise des montées linéaires de température.

Cependant ce dernier type de chromatographie est limité par le risque de volatilisation de la phase stationnaire qui provoque une augmentation du bruit de fond et une altération des colonnes. On sera donc limité par le choix des phases stationnaires possibles et il faudra posséder un chromatographe avec deux colonnes montées

en parallèle, les deux injecteurs et détecteurs réalisant un système différentiel qui compensera la variation de débit du gaz vecteur et le bruit de fond résultant de l'augmentation de la tension de vapeur de la phase stationnaire.

La chromatographie à variation de débit ne présente pas ces inconvénients mais peu d'appareils sont encore équipés de façon à réaliser une telle chromatographie.

Pour bénéficier des avantages des deux techniques, c'est-à-dire gain de temps et résolution supérieure, il faudrait réaliser une technique mixte avec une augmentation de température et de débit.

Pour notre part, compte tenu du matériel dont nous disposons, nous avons utilisé la chromatographie isotherme et isobare car elle s'est révélée être la plus adaptée à nos besoins de reproductibilité tout en nous donnant satisfaction sur le plan de la résolution.

B/ Appareillage

La figure 2 représente les circuits de gaz du modèle Girdel 75 FS 1 avec lequel nous avons effectué nos travaux de chromatographie.

a) Schéma de fonctionnement

Le gaz vecteur accède avec un débit constant à l'injecteur, par l'intermédiaire d'une chambre de recul laminaire chauffée, pour ensuite passer par la colonne puis le détecteur.

Le produit à analyser est injecté à travers une membrane élastique et entraîné vers la colonne par le gaz vecteur. Les différents composés séparés dans la colonne, pourvue de la phase stationnaire, entrent successivement dans le détecteur. L'arrivée

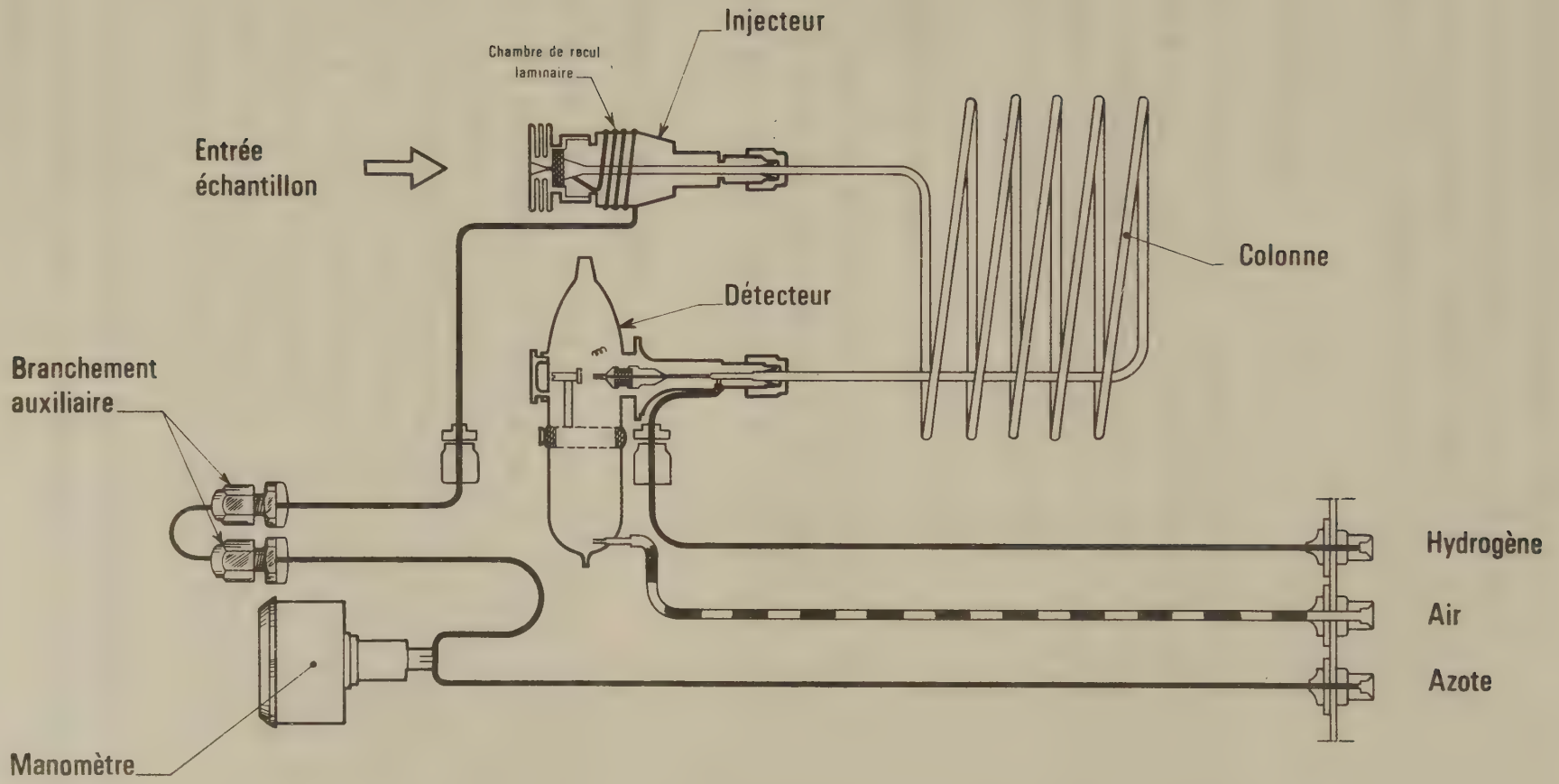


Figure 2 _ FOUR GIRDEL 75 FS-1._ Schéma de principe des circuits des gaz.

d'un produit dans le détecteur provoque une modification du courant. Le courant,recueilli par un électromètre,est transmis à un enregistreur qui inscrit sur une bande de papier la valeur du signal correspondant à la quantité de produit passant dans le détecteur.

b) Gaz vecteur

Il est généralement contenu dans une bouteille sous pression. On utilise surtout l'azote ou l'helium. Nous avons eu recours à l'azote mais on peut également utiliser l'hydrogène, l'argon, le gaz carbonique. Quelque soit le gaz utilisé, il doit être parfaitement pur pour obtenir des résultats reproductibles.

c) Mesure du débit

Le débit va dépendre de la pression du gaz et de la perméabilité de la colonne. Une pression constante en tête de la colonne est obtenue avec un manodétendeur à simple ou double étage.

d) Chambre d'injection

Sa forme et son volume doivent répondre à certaines normes qui évitent les phénomènes de diffusion et le ralentissement du passage de l'échantillon vers la tête de la colonne. Pour l'introduction de nos échantillons, nous n'avons pas utilisé le système de vannes à gaz, nous avons préféré utiliser une seringue à gaz type Hamilton qui a la propriété d'être absolument étanche et de posséder une aiguille soudée. L'emploi d'une aiguille à extrémité plus large que celle utilisée pour les liquides nous a obligés à changer très souvent la membrane d'injection pour éviter toute fuite.

Des dispositifs de pyrolyse peuvent être adaptés au niveau de la chambre d'injection pour les substances dont la tension de vapeur est négligeable.

e) Colonnes

Elles sont habituellement constituées par un tube métallique d'un diamètre extérieur d'environ 3,10mm comme les colonnes que nous avons utilisées. La colonne est remplie par des grains d'un solide broyé appelé le support. Nous avons utilisé comme support le Chromosorb W, constitué par un mélange de carbonate de sodium et de diatomite. C'est sur ce support que sera réparti très uniformément le liquide constituant la phase stationnaire.

f) Phase stationnaire

Le choix de la phase stationnaire va dépendre de la composition du mélange à analyser. Pour notre part, nous avons eu recours dans un premier temps à la phase "Silicone SE_{30}" mais, après avoir effectué d'autres essais avec de nombreuses phases stationnaires, nous avons retenu le Polyéthylèneglycol ou Carbowax 600 à 2 p.100 de potasse. La phase stationnaire doit présenter une affinité différente pour tous les constituants du mélange et la polarité des phases va jouer un rôle primordial. Il faut également conditionner une colonne pour éliminer les impuretés volatiles de la phase stationnaire par chauffage de la colonne parcourue par le gaz vecteur. Malgré ce conditionnement, lors de son utilisation à température programmée, la phase stationnaire va se volatiliser. Ce phénomène appelé "décharge" va provoquer une élévation de la ligne de base qui peut éventuellement être compensée par l'utilisation de deux colonnes identiques et d'un système d'enregistrement différentiel. Ne possédant pas ce dispositif, nous avons utilisé pour nos travaux une température de 50ºC qui s'est révélée efficace pour la séparation des composés et qui nous a permis, d'une part, de rendre négligeable le phénomène de décharge et, d'autre part, d'éviter un vieillissement rapide des colonnes.

g) Détecteurs

Le catharomètre, le détecteur à capture d'électrons et le détecteur à ionisation de flamme représentent les principaux types de détecteurs couramment utilisés. Nous décrirons le détecteur à ionisation de flamme que nous avons utilisé pour nos travaux :

La substance éluée arrive dans une flamme d'hydrogène brûlant dans l'air et augmente considérablement le nombre d'ions formés. Ce courant d'ions est collecté par une électrode ayant un potentiel de 100 à 300 volts puis il est amplifié et enregistré.

L'alimentation de ce détecteur nécessite l'emploi simultané d'hydrogène et d'air. L'air est toujours fourni en bouteille mais l'hydrogène peut être fourni également par des appareils à électrolyse comme celui que nous avons utilisé de type Elhygen.

Les débits d'air et d'hydrogène ont été réglés à l'aide de restricteurs calibrés pour obtenir des débits bien déterminés. En effet, les débits devront être rigoureusement constants pour éviter un bruit de fond du détecteur.

Nous exposerons maintenant les moyens qui nous ont permis d'effectuer la séparation, l'identification et l'évaluation quantitative des différents composés des gaz.

C/ Séparation

La séparation des différents constituants du mélange gazeux que nous avons analysé nous a conduit à essayer différents types de phase stationnaire. Nous avons renoncé à l'utilisation d'adsorbants solides car ils présentent l'inconvénient d'avoir une activation non reproductible. Notre choix a été guidé par le souci de séparer d'éventuels métabolites volatils comme les amines, alcools,

aldéhydes et cétones à chaîne courte. Nous avons tout d'abord utilisé une colonne de silicones SE_{30} qui séparait quelques constituants mais qui laissait apparaître des traînées pour les derniers pics. Nous avons ensuite essayé des colonnes dont les phases stationnaires étaient les suivantes :

- Succinate de polyéthylène glycol (D.E.G.S.)
- Hallcomid
- Quadrol (N,N,N',N'-Tetrakis (2 hydroxy-propyl) éthylène-diamine)
- Cyanosilicone
- Polyéthylène glycol ou Carbowax

C'est cette dernière phase, additionnée de 2 p.100 de potasse, que nous avons retenue car elle réalise la meilleure séparation et donne une majorité de pics symétriques.

Les chromatogrammes figurant dans la partie "Résultats" ont été obtenus dans les conditions opératoires suivantes :

- Injection de $2cm^3$ de gaz prélevés avec une seringue Hamilton
- Colonne de Poly-éthylène glycol 600 avec 2 p.100 de potasse d'un diamètre de 3,10mm et d'une longueur de 3 mètres
- Température du four : 50ºC
- Température de l'injecteur-détecteur : 80ºC
- Gaz vecteur : Azote sous une pression de 1,5 Bar
- Vitesse de déroulement du papier : 2,54 cm/minute

D/ Identification

Nous avons renoncé à l'identification des pics par les indices de rétention de Kovats qui font intervenir des mesures et des calculs trop complexes. La récupération d'une fraction de chaque composé n'étant pas réalisable avec l'appareillage que nous avons utilisé et les quantités de substances éluées étant extrêmement faibles, nous avons, dans un premier temps, identifié certains pics à l'aide de substances étalons très pures, puis, dans un deuxième temps, utilisé le couplage avec la spectrométrie de masse que nous décrirons dans un autre chapitre.

Nous avons tout d'abord calculé le temps de rétention selon les conditions opératoires décrites précédemment pour les substances suivantes :

- Méthyl, diméthyl et triméthylamine
- Ethyl, diéthyl et triéthylamine
- Propylamine
- Butylamine
- Acétone, acétyl-méthylcarbinol ou acétoïne, diacétone alcool, butanone, diacétyle.
- Méthylal, Acétaldéhyde
- Méthanol, Ethanol, Propanol, Isopropanol, Butanol, Isobutanol, Alcool amylique, 2-3 Butanediol.

Devant la similitude des temps de rétention de certaines de ces substances avec ceux de composés représentés par certains pics des chromatogrammes obtenus, nous avons pu confirmer l'identité d'une substance en ajoutant en très faible quantité le produit étalon au mélange gazeux étudié. Cette addition a augmenté spécifiquement la hauteur du pic considéré. Ces essais ont été effectués à 50º et à 60º, et aucune modification dans la superposition des pics n'est apparue à la température de 60º.

Nous avons pu,de cette façon, identifier les substances suivantes : Acétone, Méthanol, Isopropanol, Ethanol, Propanol, Isobutanol et Butanol.

Il faut noter que l'hydrogène,qui est le constituant essentiel des différents mélanges gazeux analysés,ne donne aucune réponse avec le détecteur à ionisation de flamme.

E/ Evaluation quantitative

JAMES et MARTIN avaient, en 1952, réalisé un détecteur avecune burette enregistreuse qui leur permettait de chiffrer leurs résultats par une méthode volumétrique. Actuellement, considérant que les pics obtenus correspondent à peu près à une courbe de Gauss, il est possible de calculer l'aire délimitée par cette courbe pour apprécier la quantité de substance éluée.

Le calcul de l'aire du pic peut être réalisé à l'aide d'intégrateurs de type électromécanique, électronique ou mécanique comme le planimètre mais on peut également mesurer l'aire d'un pic par découpage et pesée,ou tout simplement par une méthode géométrique. Nous avons utilisé cette dernière méthode car la majorité de nos pics étaient symétriques.

Nous avons évalué quantitativement les pics obtenus en respectant très strictement les conditions opératoires au cours des différentes séparations et en multipliant l'aire du pic par l'atténuation de l'électromètre du chromatogramme. La surface des pics a été calculée à partir des chromatogrammes directement enregistrés selon une vitesse de déroulement du papier de 2,54 cm/minute. Les chromatogrammes figurant dans la partie "Résultats" ont été réduits par rapport aux chromatogrammes originaux. L'atténuation,correspondant à chaque pic et représentée par le sigle $\times$,est mentionnée dans la légende de ces chromatogrammes.

Il faut noter également que nous n'avons pas tenu compte du premier pic apparu sur les chromatogrammes, celui-ci résultant surtout d'une perturbation due à l'injection.

Cette évaluation nous a ainsi permis, à défaut de mesure absolue, une étude relative des différentes substances volatiles d'un mélange gazeux obtenu à partir de 11 souches de bactéries anaérobies.

IV- COUPLAGE DE LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE ET DE LA SPECTROMETRIE DE MASSE

Pour obtenir une identification plus précise des pics de nos chromatogrammes, nous avons eu recours au couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse. La spectrométrie de masse présente, en effet, une très grande sensibilité et son pouvoir de détection spécifique ne demande qu'une quantité très faible de composé. Elle nous est apparue plus intéressante que certaines autres techniques comme la spectrométrie infra-rouge et la résonance magnétique nucléaire. Avant d'étudier la spectrométrie de masse il nous semble plus logique d'exposer les raisons de son couplage avec la chromatographie en phase gazeuse et les moyens qui permettent de réaliser un tel couplage (28,47,64,95,102).

La chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse se complètent pour plusieurs raisons :

- la quantité d'échantillon nécessaire pour l'analyse est du même ordre de grandeur,
- dans les deux cas l'analyse se conduit en phase vapeur,
- les temps demandés par chaque méthode sont compatibles, ainsi un pic du chromatogramme permet d'enregistrer un ou plusieurs spectres de masse.

Cependant, la spectrométrie de masse et la chromatographie en phase gazeuse diffèrent par un paramètre : un chromatographe travaille à la pression atmosphérique avec un gaz vecteur ayant un débit compris entre 1 et 60 cm^3/minute alors que le spectromètre de masse ne travaille qu'à une pression inférieure à 10^{-4} mm de mercure. Il faut donc utiliser un séparateur car le couplage n'est

réalisable directement (44,96) que dans le cas de l'utilisation de colonnes capillaires dont le débit de gaz vecteur reste inférieur à 1 cm^3/mn N'utilisant pas de colonnes capillaires dans notre technique chromatographique, nous avons effectué le couplage grâce à un séparateur de type Biemann-Watson. Nous décrirons ce séparateur ainsi que les deux autres types de séparateurs qui existent à l'heure actuelle, puis nous exposerons la technique même de la spectrométrie de masse et les résultats obtenus.

Séparateur type Biemann-Watson (103 et 104) (Fig.3)

Le gaz porteur, l'hélium, diffuse à travers un verre fritté tandis que le composé est véhiculé vers la source d'ions. Ce séparateur existe en simple ou double étage. C'est en utilisant ce type de séparateur à double étage que nous avons pu obtenir les spectres correspondant à la majorité des pics de nos chromatogrammes.

Séparateur type Jet (Becker-Rhyage) (91) (Fig.4)

Ce séparateur est représenté par un canal central bordé de petits canaux latéraux. Les molécules les plus lourdes restent dans le canal central tandis que les molécules les plus légères, comme l'hélium, circulent préférentiellement dans les petits canaux latéraux et sont pompées. La moitié environ des molécules est perdue par ce procédé. Tous les essais que nous avons effectués avec ce séparateur ne nous ont pas donné de résultats satisfaisants.

Séparateur type membrane (63) (Fig.5)

Dans ce séparateur, les composés organiques passent à travers une membrane en silicone tandis que certains gaz comme l'hélium sont arrêtés. Nous n'avons pas effectué d'essais avec ce séparateur car il n'équipait pas le matériel que nous avons utilisé.

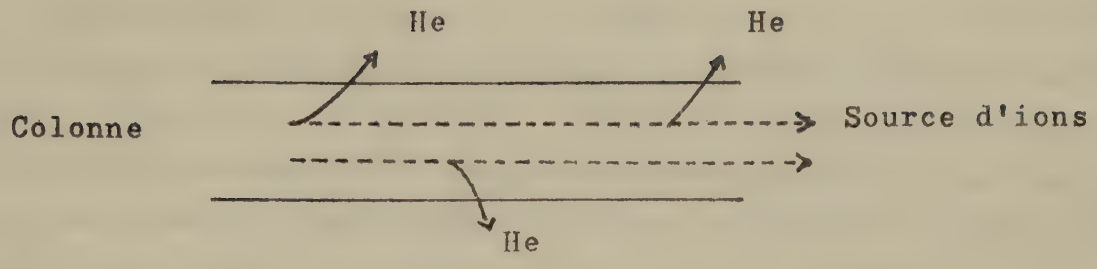


Figure 3 - Séparateur type Biemann-Watson

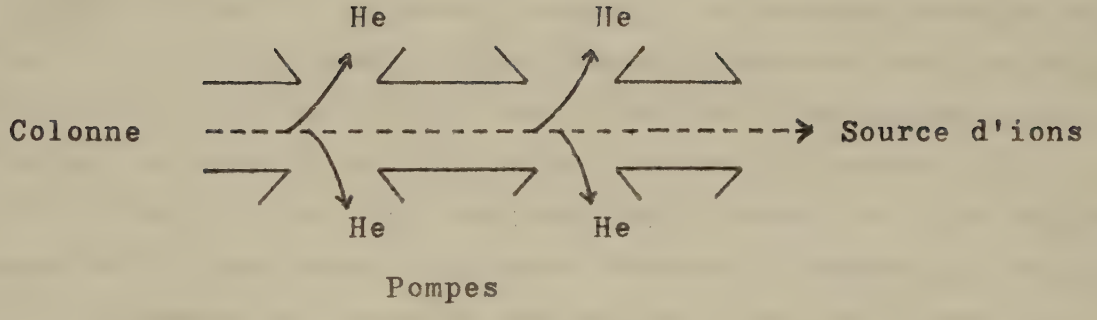


Figure 4 - Séparateur Jet (Becker-Ryhage)

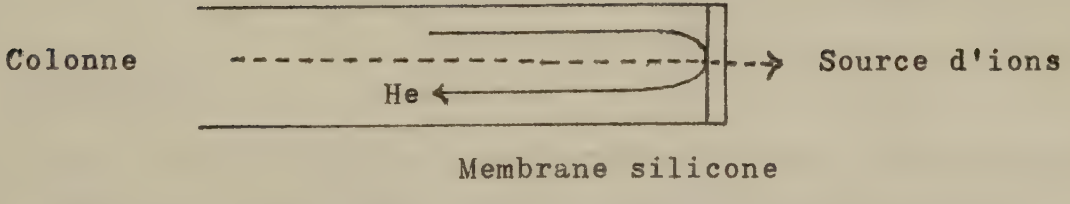


Figure 5 - Séparateur type membrane

V- SPECTROMETRIE DE MASSE

Initialement utilisée pour permettre l'identification des isotopes d'uranium sous forme de fluorures, la spectromètrie de masse a trouvé par la suite un large développement dans les laboratoires de contrôle de l'industrie du pétrole pour l'analyse des mélanges gazeux d'hydrocarbures. Cette méthode, décrite dans plusieurs manuels (8,10,32,65) et publications (17,18,19,20,60,78), a été étendue à l'analyse d'autres mélanges gazeux mais, par la suite, la possibilité d'obtenir des vides de l'ordre de 10^{-8}mm de mercure et surtout l'amélioration du système d'introduction et de chauffage de l'échantillon ont permis l'analyse de substances peu volatiles.

A/ Principe

Un spectromètre de masse convertit un composé inconnu en un certain nombre de produits identifiables caractéristiques de la molécule initiale. En effet, sous l'action d'un bombardement électronique, le composé est ionisé par pertes d'électrons $M + e = 2\,e + M^+$ mais il va être simultanément dissocié et les fragments de masses variées seront également ionisés. L'abondance relative de ces fragments est caractéristique de la molécule dans des conditions expérimentales données. Les ions sont ensuite accélérés, passent dans un analyseur en général électromagnétique et sont séparés selon leur masse (plus exactement selon le rapport m/e de leur masse à leur charge). Le signal correspondant est amplifié et enregistré. En faisant varier rapidement le champ électromagnétique, l'enregistrement obtenu représente le spectre de masse.

B/ Appareillage

Nous avons utilisé un spectromètre de masse "Varian Mat System CH5" (Fig. 6) dont nous allons citer les particularités tout en décrivant le schéma classique d'un spectromètre.

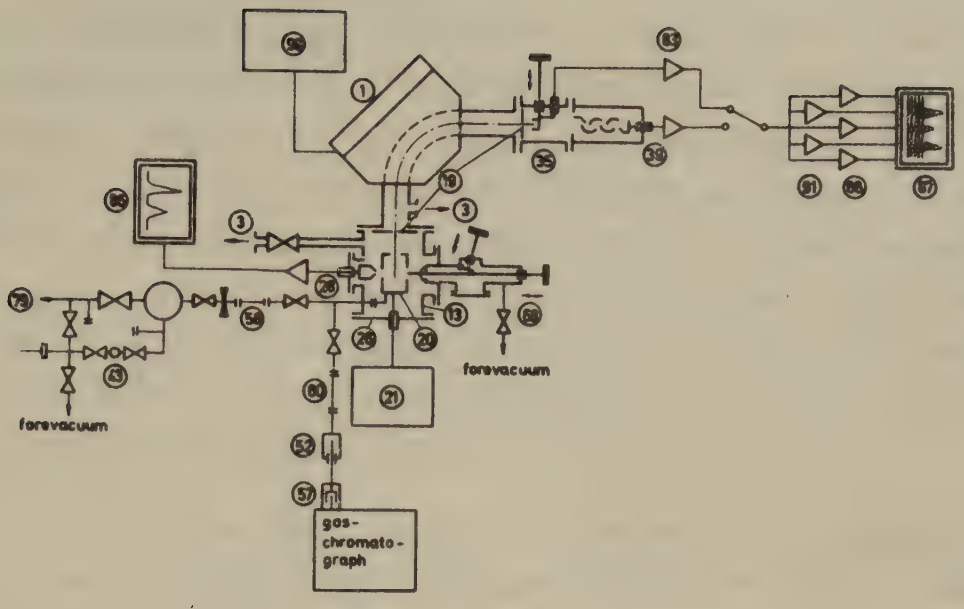


Figure 6 - Schéma du spectromètre de masse "VARIAN-MAT CH5"

1- Unité de base

3- Système de pompage

13- Capot de source d'ions

19- Fentes variables

20- Sources d'ions

21- Régulateur du courant d'émission

26- Bride de source d'ions

28- Mesure du courant ionique total

35- Collecteur

39- Multiplicateur d'électrons

43- Système d'introduction indirecte

52- Séparateur d'hélium

57- Interface de couplage

58- Conduite

60- Conduite

68- Sas à four pour introduction directe

79- Système de pompage "haut vide"

83- Amplificateur de courant continu

86- Enregistreur potentiométrique

87- Enregistreur galvanométrique

88- Amplificateur à 3 canaux

91- Amplificateur à 2 canaux

99- Régulateur du courant magnétique

a) Le système d'introduction des échantillons représente une partie importante d'un spectromètre car il doit amener à la source une quantité constante d'échantillons durant l'enregistrement du spectre. L'échantillon s'échappe d'un réservoir, sous vide et chauffé, à travers un petit orifice pour arriver à la source d'ions à une vitesse constante. La grande chute de pression existant au travers de la fuite exige que l'échantillon ait une tension de vapeur de 10^{-2} torr au moins à une température inférieure à sa décomposition. Le spectromètre CH_5 que nous avons utilisé peut être muni de trois types de système d'introduction:

. un système, avec réservoir, permettant une analyse quantitative d'un gaz, d'un liquide ou d'un solide et dont la température peut varier de 20º à 250º.

. un système d'introduction directe, sans réservoir, pour l'analyse qualitative d'échantillons en quantité inférieure au microgramme et dont la température peut varier de -100º à 450º. Ce mode d'introduction a été rendu possible grâce aux techniques d'enregistrement rapide tel que l'enregistrement sur plaque photographique et grâce à un déroulement accéléré de l'échelle des masses. Ces techniques ont réduit le temps pendant lequel il était nécessaire d'avoir un écoulement constant de l'échantillon et ont donc diminué le besoin d'un réservoir.

. un système de couplage avec un chromatographe en phase gazeuse par l'intermédiaire de différents types de séparateurs.

b) La source d'ions doit avoir, en l'absence de tout échantillon, une pression d'environ 10^{-7} torr. Cette pression sera obtenue grâce à de puissantes pompes à huile ou à mercure. Les électrons qui vont bombarder l'échantillon sont émis par un filament incandescent et traversent la chambre d'ionisation pour rejoindre une anode du côté opposé. Les énergies d'électrons sont habituellement

de 50 à 100 électrons volts donc supérieures à l'énergie requise pour l'ionisation des molécules. La pression de l'échantillon dans la source d'ions étant inférieure à 10^{-4} torr, les collisions secondaires entre les ions sont minimes.

Les ions positifs formés sont chassés hors de la source à l'aide d'un potentiel relativement faible appliqué à un repousseur et passent ensuite entre des plaques de focalisation. Les faibles potentiels positifs appliqués au repousseur et aux plaques de focalisation permettent de bien délimiter le faisceau d'ions. Cette opération est analogue à la focalisation des rayons lumineux dans un spectrophotomètre. Les ions positifs vont être accélérés par deux électrodes, les plaques d'accélération, entre lesquelles règne une différence de potentiel de 3.000 volts. Cette accélération va rendre le faisceau ionique le plus possible isocinétique pour éviter les aberrations de focalisation et augmenter la résolution de l'appareil.

En effet, la source d'ions n'est pas ponctuelle et les électrons ne proviennent pas de la même partie du filament. Le faisceau électronique possédant une certaine largeur, les molécules ne seront pas toutes ionisées au même endroit et il en résultera une légère différence d'énergie cinétique pour des ions de même masse. La tension d'accélération aura pour but de rendre négligeable cette différence initiale.

On peut alors séparer les rayons d'ions positifs sortant de la source suivant le rapport m/e des différents ions par différentes techniques mais c'est surtout la déflexion magnétique qui est utilisée. Une autre technique, dite à temps de vol, mesure les masses par le temps que mettent les ions pour accomplir un parcours déterminé. Pour notre part, nous décrirons les divers éléments de cette technique de déflexion magnétique que nous avons utilisée avec le spectromètre CH_5.

c) un tube d'analyse métallique d'un angle de déviation de 90º passe dans l'entrefer d'un électro-aimant. Ce tube est relié d'une part à la source d'ions, d'autre part au collecteur.

d) Un électro-aimant qui va provoquer une déflexion de 90º du faisceau ionique. Les particules de même rapport m/e sont animées d'une vitesse légèrement différente et ne sont pas focalisées sur une surface ponctuelle mais sur un segment de courbe. On utilise pour cette raison une fente de sortie assez étroite qui permet à l'appareil de gagner en résolution mais de perdre en sensibilité. Le pouvoir séparateur ou pouvoir de résolution est en effet une des principales caractéristiques d'un spectromètre de masse. La séparation en deux pics distincts de deux masses successives M et M + 1 représente le pouvoir de résolution de l'appareil. La résolution est définie lorsque deux pics d'amplitude H voisine se chevauchent avec une hauteur de vallée égale ou inférieure à 10 p.100 de H. Cependant la résolution ne dépend pas uniquement des largeurs de fente (78). Un chevauchement des images de masses M et M + 1 intervient car il y a toujours en pratique un élargissement de l'image due aux différences d'énergie cinétique ou thermique règnant entre les ions dès leur formation. Aussi pour augmenter le pouvoir de résolution, il est nécessaire de faire intervenir les deux focalisations en vitesse et en angle par l'intermédiaire d'un champ électrostatique assurant la première focalisation et d'un champ magnétique assurant la seconde. Les spectromètres peuvent atteindre un pouvoir de résolution allant de 100 à 500.000 mais le parcours des ions y est très long.

Le spectromètre CH_5 que nous avons utilisé permet d'obtenir un pouvoir de résolution de 100 à 10.000 avec une hauteur de vallée égale à 10 p.100.

e) Un collecteur qui reçoit le faisceau ionique après la fente de sortie. La variation de champ permettra un balayage du collecteur par des ions de m/e croissant. Le faisceau d'ions positifs est reçu dans un cylindre de Faraday et le courant produit est amplifié par des multiplicateurs d'électrons. Cette amplification peut rendre possible la détection d'un seul ion arrivant au collecteur. Cette méthode permet donc de résoudre des problèmes qui demandent une très grande sensibilité.

f) Un enregistreur qui peut être représenté par un oscillographe, un lecteur à plume et surtout actuellement par un système photographique. L'enregistrement sur pellicule s'effectue grâce aux spots lumineux issus de galvanomètres à miroirs réglés sur des sensibilités différentes. Le développement de la pellicule est supprimé grâce à l'emploi de la lumière ultraviolette. Nos enregistrements de spectre ont été effectués selon cette technique photographique.

g) Le spectre : L'interaction des électrons avec la molécule aboutit à la formation de l'ion moléculaire par perte d'un électron, c'est le pic moléculaire. Une partie de cet ion moléculaire est ensuite décomposée pour donner les ions fragments qui représenteront les autres pics du spectre de la molécule. Le pic le plus important du spectre est le pic de base, il correspond le plus souvent au pic moléculaire et sa valeur arbitrairement égale à 100 permettra d'établir la valeur relative des autres pics. L'interprétation du spectre détermine comment ces différents ions sont assemblés dans la structure moléculaire initiale. Durant ces dernières années, de telles corrélations ont été établies pour un grand nombre de molécules que l'on retrouve répertoriées dans les atlas de spectres de masse (9,33).

La séparation chromatographique nous a permis d'éviter les interprétations complexes d'un mélange où l'on peut retrouver des pics de masse semblable appartenant à des composés différents.

C/ Conditions opératoires

Nous avons pu obtenir nos différents spectres en utilisant un spectromètre de masse "Varian-Mat type CH_5" qui a fonctionné selon les conditions opératoires suivantes :

- température de la source d'ions : 250º
- pouvoir de résolution réglé à 1000
- énergie des électrons : 70eV

Le spectromètre était équipé d'un séparateur type Biemann-Watson à double étage en verre fritté qui élimine l'hélium, gaz vecteur utilisé dans le couplage dont le débit dans la colonne était de 20cm^3/minute.

L'hydrogène constituant essentiel du mélange, est également éliminé au niveau du séparateur et n'est pas détecté par le spectromètre de masse.

D/ Identification des spectres

Nous avons pu identifier d'après leurs spectres les substances suivantes :

TRIMETHYLAMINE : $(CH_3)_3N$ M = 59

m/e	Intensité relative
30	30
42	45
58	100
59	45

ACETONE : $CH_3-CO-CH_3$ M = 58

m/e	Intensité relative
39	3,09
43	100
44	2,42
57	1,18
58	42,18

ACETATE D'ETHYLE : $CH_3-COOC_2H_5$ M = 88

m/e	Intensité relative
42	4,62
43	100
45	14,58
88	6,99

ETHANOL : CH_3-CH_2OH M = 46

m/e	Intensité relative
29	25
30	6
31	100
46	16

DISULFURE DE DIMETHYLE : $H_3C-S-S-CH_3$ M = 94

m/e	Intensité relative
94	100
67	59,5
26	41,3
39	37,1

PROPANOL : $CH_3-CH_2-CH_2OH$ M = 60

m/e	Intensité relative
29	9,07
31	100
32	2,27
60	10,65

ISOBUTANOL : $CH_3-\underset{\displaystyle CH_3}{\overset{|}{CH}}-CH_2OH$ M = 74

m/e	Intensité relative
40	57,76
41	61,74
42	100
74	15,28

BUTANOL : $CH_3-CH_2-CH_2-CH_2OH$ M = 74

m/e	Intensité relative
41	57,81
43	50,94
56	100
57	7,52

Par couplage de la chromatographie en phase gazeuse et de la spectrométrie de masse, nous avons pu ainsi confirmer l'identification de l'acétone, de l'éthanol, du propanol,de l'isobutanol et du butanol. En ce qui concerne l'isobutanol,son identification a été réalisée aisément pour Clostridium sporogenes mais par contre a été plus difficile pour Welchia perfringens, Clostridium chauvei, Clostridium histolyticum et Clostridium aerofoetidum. Nous avons également pu obtenir l'identification de trois autres composés comme la trimethylamine, l'acétate d'éthyle et le disulfure de diméthyle.

C H A P I T R E III

RESULTATS

Nous citerons les résultats obtenus pour chaque bactérie étudiée en respectant la classification de A.R.PREVOT (86) représentée par le tableau I .

TABLEAU I

Classe des SPORULALES

Ordre des CLOSTRIDIALES

Famille des CLOSTRIDIACEAE

Genre WELCHIA
- Welchia perfringens

Genre CLOSTRIDIUM
- Clostridium septicum
- Clostridium chauvoei
- Clostridium oedematiens
- Clostridium histolyticum
- Clostridium sporogenes
- Clostridium sordellii
- Clostridium bifermentans
- Clostridium aerofoetidum
- Clostridium fallax

Ordre des PLECTRIDIALES

Famille des PLECTRIDIACEAE

Genre PLECTRIDIUM
- Plectridium putrificum

Après avoir indiqué l'origine de la souche et son éventuel pouvoir toxinogène, nous exposerons pour chaque bactérie les modalités de culture et de prélèvement des gaz, le volume total des gaz, la composition des gaz et l'évaluation quantitative des composés présents dans ces gaz.

WELCHIA PERFRINGENS "souche LECHIEN"

Cette souche a été isolée en 1915 par WEINBERG et SEGUIN chez un blessé nommé LECHIEN atteint d'une gangrène gazeuse.

Le pouvoir toxinogène a été vérifié (53) par inoculation sous-cutanée à plusieurs cobayes de 0,5 cm^3 de filtrat d'une culture de 24 heures en bouillon VF glucosé. Les cobayes sont morts en 36 heures.

1) Culture

Les 50 cm^3 de milieu au thioglycolate de sodium sont ensemencés avec X gouttes d'une culture de 24 heures en bouillon VF glucosé. L'Erlenmeyer est maintenu à l'étuve à 37º pendant 5 jours.

2) Prélèvement des gaz

Avant le recueil des gaz nous ajoutons 20 cm^3 de soude 5N par l'ajutage latéral. Nous laissons quelques gouttes de soude dans cet ajutage pour éviter toute entrée d'air accidentelle. Après quelques minutes de contact, l'alcalinisation du milieu et la fixation du gaz carbonique étant réalisées, nous procédons à l'extraction des gaz par l'intermédiaire de la trompe à mercure que nous avons décrite dans le chapitre II. Au cours de la manipulation les gaz sont dessechés par le chlorure de calcium présent dans le compartiment C.

3) Volume total de gaz

Après plusieurs essais, le volume total de gaz recueilli est en moyenne de $82cm^3$ (24).

4) Composition des gaz

Les gaz sont recueillis sous mercure dans un flacon de 125 cm^3 bouché par un bouchon de caoutchouc fixé par une bague vissée. Nous prélevons à travers ce bouchon $2\,cm^3$ de gaz avec une seringue "type Hamilton". Ces $2cm^3$ injectés dans le chromatographe, fonctionnant selon les conditions opératoires décrites dans le chapitre II, nous ont permis d'obtenir le chromatogramme représenté par la figure 7 .

L'hydrogène, constituant essentiel du mélange gazeux après la fixation du gaz carbonique, n'est pas détecté dans ces conditions opératoires.

a) Identification des pics par comparaison des temps de rétention avec ceux de substances connues.

Par cette méthode, en utilisant des substances très pures, nous avons pu établir une correspondance entre certaines de ces substances et les pics suivants :

- pic 3 : acétone
- pic 6 : méthanol
- pic 7 : éthanol
- pic 8 : propanol
- pic 9 : isobutanol
- pic 10 : butanol

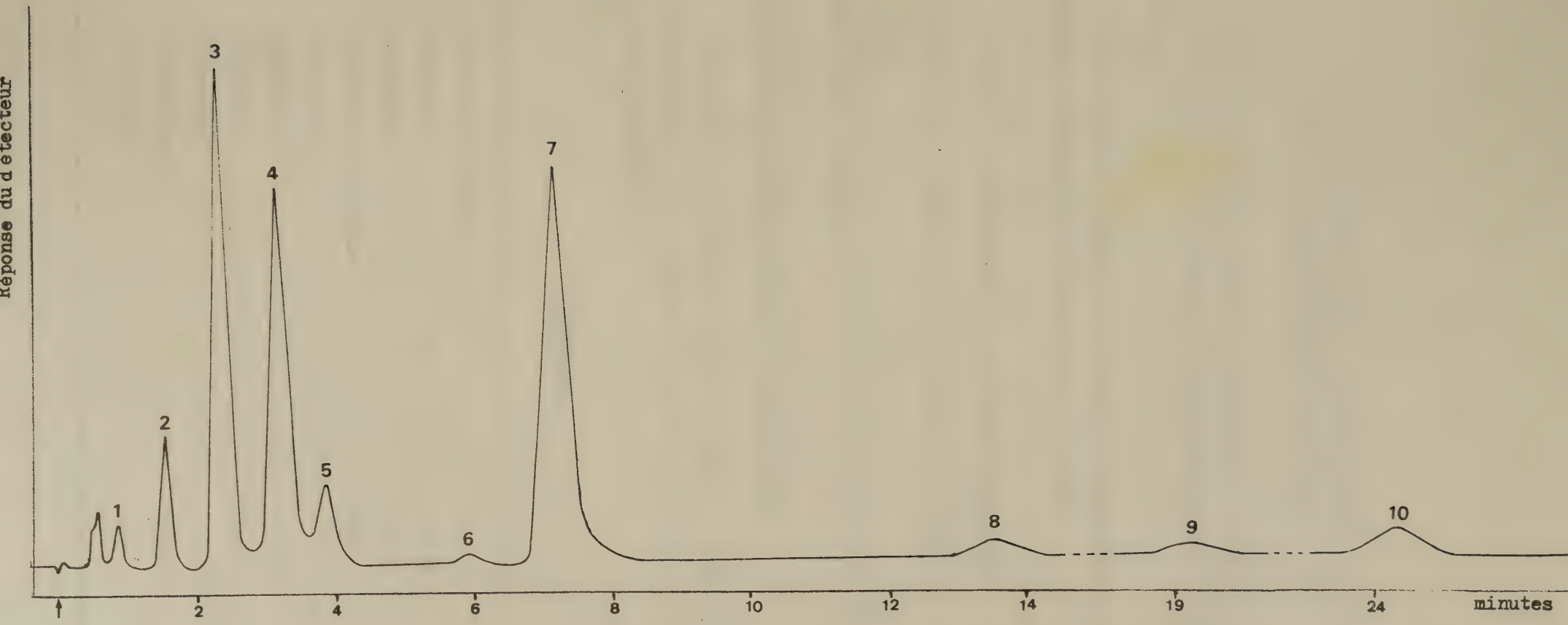


Figure 7 - Chromatogramme des gaz de Welchia perfringens

1 (x8) : Triméthylamine	4 (x32) : Acétate d'éthyle	7 (x16) : Ethanol	10 (x1) : Butanol
2 (x8) : X	5 (x8) : X	8 (x2) : Propanol	
3 (x32): Acétone	6 (x8) : Méthanol	9 (x1) : Isobutanol	

b) Identification des pics par couplage de la chromatographie et de la spectrométrie de masse

Cette technique nous a permis de confirmer l'identification de l'acétone, de l'éthanol, du propanol, de l'isobutanol et du butanol.

Elle nous a également permis de préciser la nature des composés correspondants aux pics 1 et 4.

le pic 1 correspond à la triméthylamine

le pic 4 correspond à l'acétate d'éthyle

Les pics 2 et 5 n'ont pu être identifiés par aucune des deux techniques utilisées.

5) Evaluation quantitative des composés

Cette évaluation est résumée dans le tableau II (les nombres correspondent à la surface des pics multipliée par l'atténuation du chromatographe).

TABLEAU II

Triméthylamine	2,2
Composé X	14,5
Acétone	320
Acétate d'éthyle	279
Composé X	8
Méthanol	1,4
Ethanol	211
Propanol	1,1
Isobutanol	traces
Butanol	2

Conclusion

Après alcalinisation d'une culture de 5 jours de Welchia perfringens ensemencé en milieu au thioglycolate de sodium, nous avons pu recueillir 82 cm3 de gaz essentiellement constitués d'hydrogène mais renfermant de nombreux métabolites volatils que les techniques d'analyse conventionnelles ne permettaient pas de révéler. Nous avons pour notre part, constaté la présence de 10 métabolites et réalisé l'identification de 8 d'entre eux : la triméthylamine, l'acétone, l'acétate d'éthyle, le méthanol, l'éthanol, le propanol, l'isobutanol et le butanol.

CLOSTRIDIUM SEPTICUM souche TO

Cette souche a été isolée à Toulouse en 1945 d'un faux charbon symptomatique d'une génisse.

Son pouvoir toxinogène a été vérifié (53) par inoculation sous-cutanée à plusieurs cobayes de 0,3cm^3 de filtrat d'une culture de 48 heures en bouillon VF glucosé. Les cobayes sont morts en moins de 24 heures.

1) Culture

Le milieu au thioglycolate de sodium est ensemencé comme pour Welchia perfringens et l'Erlenmeyer est maintenu à l'étuve à 37º pendant 5 jours.

2) Prélèvement des gaz

Après addition de souche 5N, l'alcalinisation du milieu et la fixation de gaz carbonique étant réalisées, nous procédons à l'extraction des gaz selon le même protocole que pour Welchia perfringens.

3) Volume total des gaz

Après plusieurs essais, le volume total des gaz recueillis est en moyenne de 64cm^3(24).

4) Composition des gaz

Nous prélevons, comme précédemment, 2cm^3 de gaz recueillis sous mercure et nous les injectons dans le chromatographe fonctionnant selon les conditions opératoires décrites dans le chapitre II. Nous obtenons le chromatogramme représenté par la figure 8 .

L'hydrogène, constituant essentiel du mélange gazeux après la fixation du gaz carbonique, n'est pas détecté dans ces conditions opératoires.

a) Identification des pics par comparaison des temps de rétention avec ceux de substances connues

Par cette méthode, en utilisant des substances très pures, nous avons pu établir une correspondance entre certaines de ces substances et les pics suivants :

- pic 3 : acétone
- pic 6 : méthanol
- pic 7 : isopropanol
- pic 8 : éthanol
- pic 9 : propanol
- pic 10 : isobutanol
- pic 11 : butanol

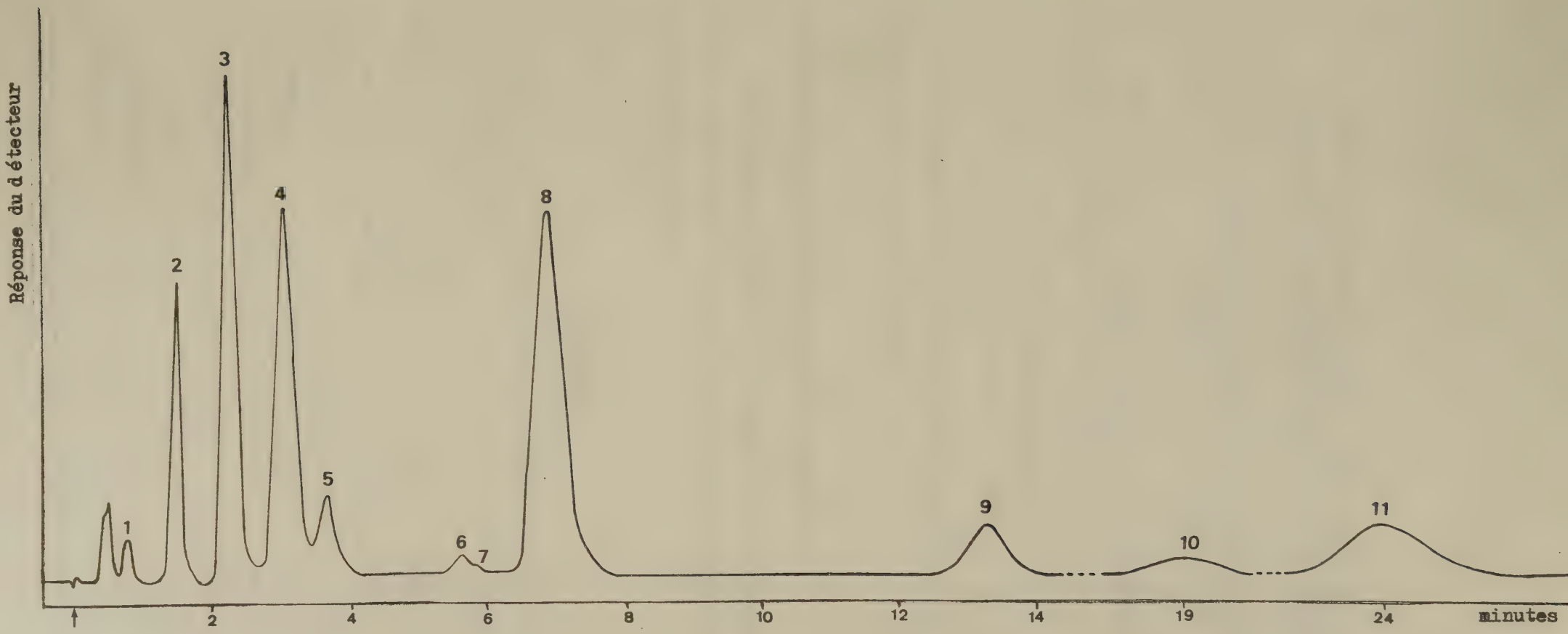


Figure 8 – Chromatogramme des gaz de *Clostridium septicum*

1 (x8) : Triméthylamine	4 (x32) : Acétate d'éthyle	7 (x8) : Isopropanol	10 (x1) : Isobutanol
2 (x8) : X	5 (x8) : X	8 (x32) : Ethanol	11 (x1) : Butanol
3 (x32) : Acétone	6 (x8) : Méthanol	9 (x1) : Propanol	

b) Identification des pics par couplage de la chromatographie en phase gazeuse et de la spectrométrie de masse

Cette technique nous a permis de confirmer l'identification de l'acétone, de l'éthanol, du propanol, de l'isobutanol et du butanol.

Elle nous a également permis de préciser la nature des composés correspondants aux pics 1 et 4.

pic 1 : triméthylamine
pic 4 : acétate d'éthyle

Les pics 2 et 5 n'ont pu être identifiés par aucune des deux techniques utilisées.

5) Evaluation quantitative des composés

Cette évaluation est résumée dans le tableau III (les nombres correspondent à la surface des pics multipliée par l'atténuation du chromatographe).

TABLEAU III

Triméthylamine	2,2
Composé X	32
Acétone	345
Acétate d'éthyle	241
Composé X	7,5
Méthanol	2,4
Isopropanol	traces
Ethanol	485
Propanol	3
Isobutanol	0,60
Butanol	4,5

Conclusion

Après alcalinisation d'une culture de 5 jours de Clostridium septicum ensemencé sur milieu au thioglycolate de sodium, nous avons pu recueillir 64cm^3 de gaz essentiellement constitués d'hydrogène mais renfermant de nombreux métabolites volatils. Nous avons constaté la présence de 11 métabolites et réalisé l'identification de 9 d'entre eux : le triméthylamine, l'acétone, l'acétate d'éthyle, le méthanol, l'isopropanol, l'éthanol, le propanol, l'isobutanol et le butanol.

CLOSTRIDIUM CHAUVOEI souche AYNAUD

Cette souche a été isolée par AYNAUD vers les années 1914-1918 d'un cas de charbon symptômatique.

Le pouvoir toxinogène a été vérifié (53) par inoculation sous-cutanée à plusieurs cobayes de 0,5cm^3 de filtrat d'une culture de 48 heures en bouillon VF glucosé. Les cobayes sont morts en 36 heures.

1) Culture

Le milieu au thioglycolate de sodium est ensemencé comme pour les germes précédents et l'Erlenmeyer est maintenu à l'étuve à 37º pendant 5 jours.

2) Prélèvement des gaz

Après addition de soude 5N, l'alcalinisation du milieu et la fixation de gaz carbonique étant réalisées, nous procédons à l'extraction des gaz selon le même protocole que pour les germes précédents.

3) Volume total des gaz

Après plusieurs essais, le volume total des gaz recueillis est en moyenne de $59 cm^3$ (24).

4) Composition des gaz

Nous prélevons, comme précédemment, $2 cm^3$ de gaz recueillis sous mercure et nous les injectons dans le chromatographe fonctionnant selon le protocole décrit dans le chapitre II. Nous obtenons le chromatogramme représenté par la figure 9 .

L'hydrogène n'est pas détecté dans ces conditions opératoires.

a) Identification des pics par comparaison des temps de rétention avec ceux de substances connues

Par cette méthode,en utilisant des substances très pures, nous avons pu établir une correspondance entre certaines de ces substances et les pics suivants :

- pic 3 : acétone
- pic 6 : méthanol
- pic 7 : éthanol
- pic 8 : propanol
- pic 9 : isobutanol
- pic 10 : butanol

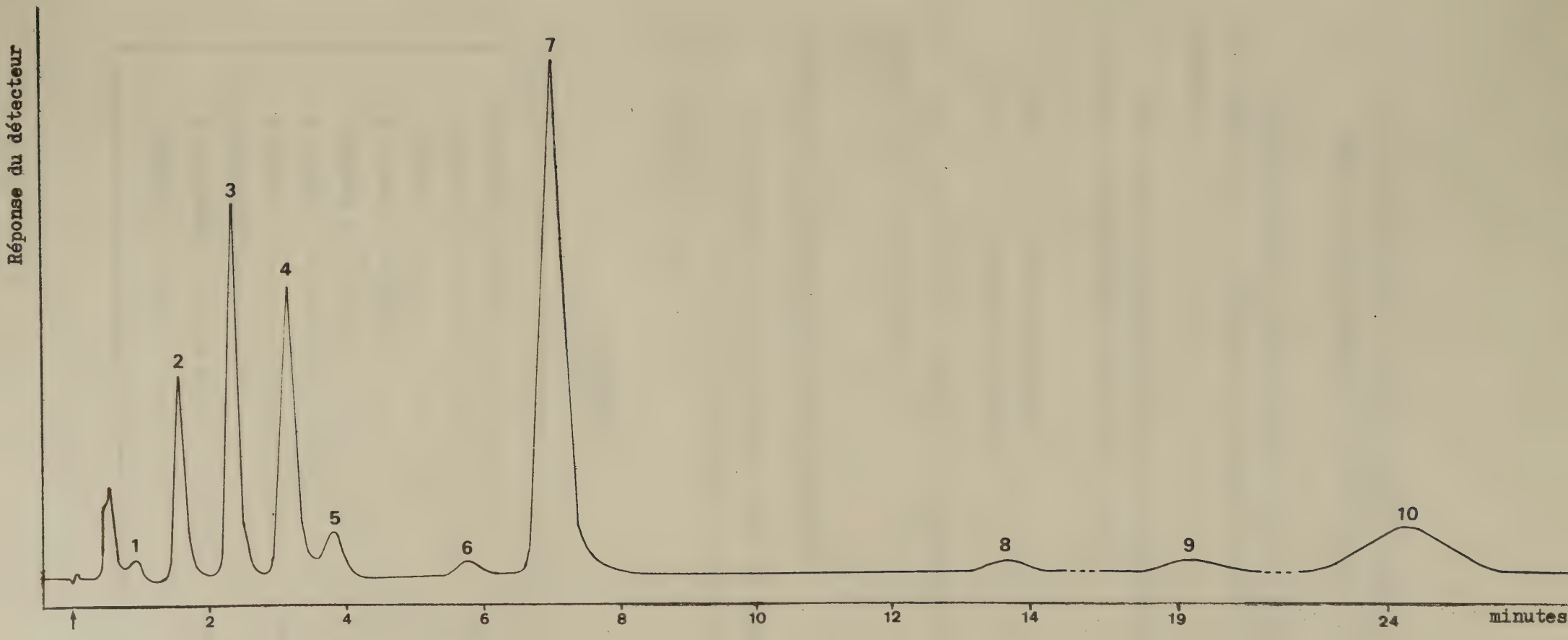


Figure 9 - Chromatogramme des gaz de *Clostridium chauvoei*

1 (x8) : Triméthylamine	4 (x16) : Acétate d'éthyle	7 (x8) : Ethanol	10 (x1) : Butanol
2 (x8) : X	5 (x8) : X	8 (x2) : Propanol	
3 (x8) : Acétone	6 (x8) : Méthanol	9 (x1) : Isobutanol	

b) Identification des pics par couplage de la chromatographie en phase gazeuse et de la spectrométrie de masse

Cette technique nous a permis de confirmer l'identification de l'acétone, de l'éthanol, du propanol, de l'isobutanol et du butanol.

Elle nous a également permis de préciser la nature des composés correspondants aux pics 1 et 4.

pic 1 : triméthylamine
pic 4 : acétate d'éthyle

Les pics 2 et 5 n'ont pu être identifiés par aucune des deux techniques utilisées.

5) Evaluation quantitative des composés

Cette évaluation est résumée dans le tableau IV (les nombres correspondent à la surface des pics multipliée par l'atténuation du chromatographe).

TABLEAU IV

Triméthylamine	1
Composé X	25
Acétone	50
Acétate d'éthyle	91
Composé X	4
Méthanol	2
Ethanol	142
Propanol	0,5
Isobutanol	traces
Butanol	2,7

Conclusion

Après alcalinisation d'une culture de 5 jours de Clostridium chauvoei ensemencé sur milieu au thioglycolate de sodium, nous avons pu recueillir 59cm^3de gaz essentiellement constitués d'hydrogène mais renfermant de nombreux métabolites volatils. Nous avons constaté la présence de 10 métabolites et réalisé l'identification de 8 d'entre eux : le triméthylamine, l'acétone, l'acétate d'éthyle, le méthanol, l'éthanol, le propanol, l'isobutanol et le butanol.

Dans le cadre de la différenciation entre Clostridium septicum et Clostridium chauvoei,que certains auteurs ne reconnaissent pas comme deux espèces distinctes, on peut noter en dehors de la présence d'isopropanol à l'état de traces, dans les gaz de Clostridium septicum, une production de métabolites légèrement supérieure pour ce dernier.

CLOSTRIDIUM OEDEMATIENS souche DELHOMME

Cette souche a été isolée en 1915 par WEINBERG et SEGUIN d'un cas de gangrène gazeuse chez un blessé nommé DELHOMME.

Son pouvoir toxinogène a été vérifié (53) par inoculation sous-cutanée à plusieurs cobayes de 0,5cm^3 de filtrat d'une culture de 48 heures en bouillon VF glucosé. Les cobayes sont morts en 24 à 36 heures.

1) Culture

Le milieu au thioglycolate de sodium est ensemencé comme pour les germes précédents et l'Erlenmeyer est maintenu à l'étuve à 37º pendant 5 jours.

2) Prélèvement des gaz

Après addition de soude 5N, l'alcalinisation du milieu et la fixation de gaz carbonique étant réalisées, nous procédons à l'extraction des gaz selon le même protocole que pour les germes précédents.

3) Volume total des gaz

Après plusieurs essais le volume total des gaz recueillis est en moyenne de 11 cm^3.

4) Composition des gaz

Nous prélevons $2cm^3$ de gaz, recueillis sous mercure, comme précédemment et nous les injectons dans le chromatographe fonctionnant selon le protocole décrit dans le chapitre II. Nous obtenons le chromatogramme représenté par la figure 10 .

L'hydrogène n'est pas détecté dans ces conditions opératoires.

a) Identification des pics par comparaison des temps de rétention avec ceux de substances connues.

Par cette méthode, en utilisant des substances très pures, nous avons pu établir une correspondance entre certaines de ces substances et les pics suivants :

- pic 3 : acétone
- pic 6 : méthanol
- pic 7 : isopropanol
- pic 8 : éthanol
- pic 10 : propanol
- pic 11 : isobutanol
- pic 12 : butanol

b) Identification des pics par couplage de la chromatographie en phase gazeuse et de la spectrométrie de masse.

Cette technique nous a permis de confirmer l'identification de l'acétone, de l'éthanol, du propanol, de l'isobutanol et du butanol.

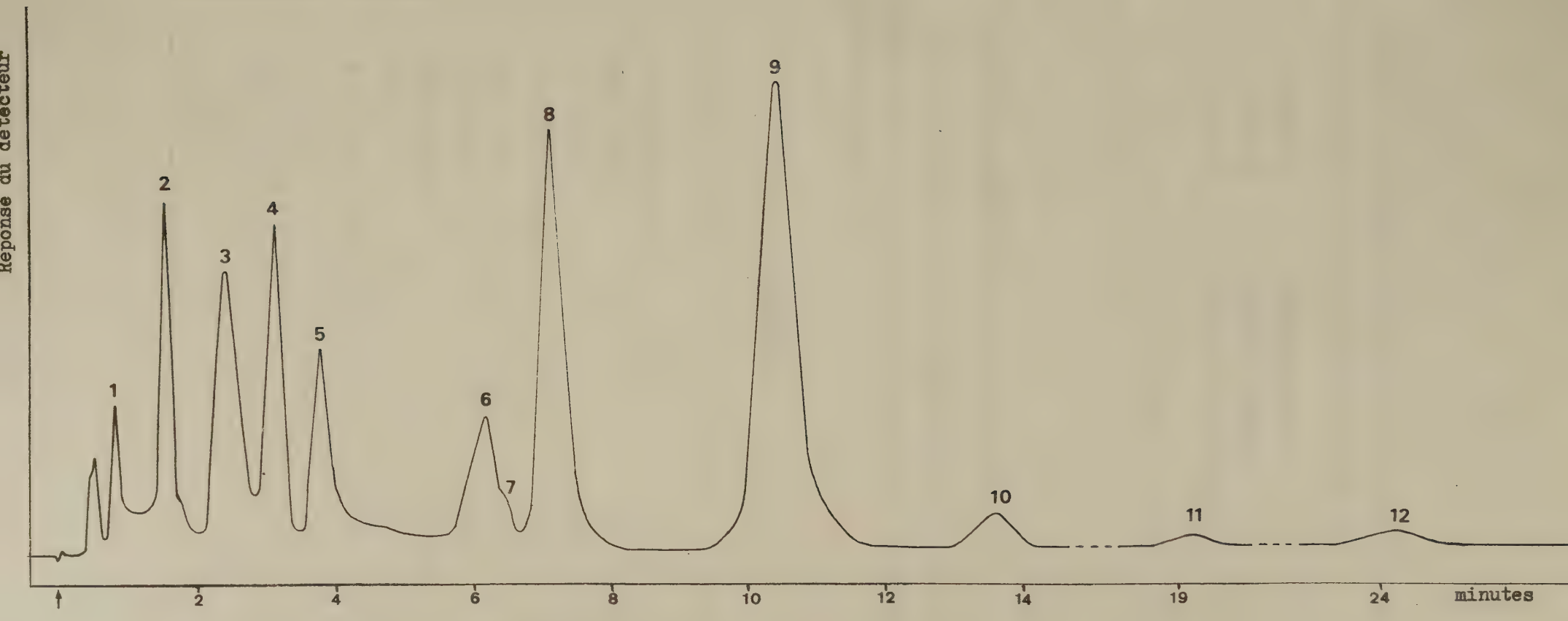


Figure 10 – Chromatogramme des gaz de *Clostridium oedematiens*

1 (×8) : Triméthylamine	4 (×64) : Acétate d'éthyle	7 (×8) : Isopropanol	10 (×1) : Propanol
2 (×8) : X	5 (×8) : X	8 (×8) : Ethanol	11 (×1) : Isobutanol
3 (×128) : Acétone	6 (×8) : Méthanol	9 (×32) : Disulfure de diméthyle	12 (×1) : Butanol

Elle nous a également permis de préciser la nature des composés correspondant aux pics 1, 4 et 9.

- pic 1 : triméthylamine
- pic 4 : acétate d'éthyle
- pic 9 : disulfure de diméthyle

Les pics 2 et 5 n'ont pu être identifiés par aucune des deux techniques utilisées.

5) Evaluation quantitative des composés

Cette évaluation est résumée dans le tableau V (les nombres correspondent à la surface des pics multipliée par l'atténuation du chromatographe).

TABLEAU V

Triméthylamine	18,5
Composé X	58,6
Acétone	1241
Acétate d'éthyle	736
Composé X	36,4
Méthanol	34,4
Isopropanol	traces
Ethanol	144
Disulfure de diméthyle	1056
Propanol	11
Isobutanol	1
Butanol	1,25

Conclusion

Après alcalinisation d'une culture de 5 jours de Clostridium oedematiens, ensemencé sur milieu au thioglycolate de sodium, nous avons pu recueillir 11cm^3 de gaz essentiellement constitués d'hydrogène mais renfermant de nombreux métabolites volatils.

Nous avons constaté la présence de 12 métabolites et réalisé l'identification de 10 d'entre eux : la triméthylamine, l'acétone, l'acétate d'éthyle, le méthanol, l'isopropanol, l'éthanol, le disulfure de diméthyle, le propanol, l'isobutanol et le butanol.

Nous pouvons noter la production d'un métabolite sulfuré, le disulfure de diméthyle, absent dans les gaz des germes précédemment étudiés.

CLOSTRIDIUM HISTOLYTICUM, souche TRO 2E

Cette souche a été isolée en 1948 du sol de l'ilôt TROMLIN

Son pouvoir toxinogène a été vérifié (53) par inoculation sous-cutanée à plusieurs cobayes de 0,5cm^3 de filtrat d'une culture de 24 heures en bouillon VF glucosé. Les cobayes sont morts en moins de 36 heures.

1) Culture

Le milieu au thioglycolate de sodium est ensemencé comme pour les germes précédents et l'Erlenmeyer est maintenu à l'étuve à 37º pendant 5 jours.

2) Prélèvement des gaz

Après addition de soude 5N, l'alcalinisation du milieu et la fixation du gaz carbonique étant réalisées, nous procédons à l'extraction des gaz selon le même protocole que pour les germes précédents.

3) Volume total des gaz

Après plusieurs essais le volume total des gaz recueillis est en moyenne de $5cm^3$.

4) Composition des gaz

Nous prélevons $2cm^3$ de gaz, recueillis sous mercure, comme précédemment et nous les injectons dans le chromatographe fonctionnant selon le protocole décrit dans le chapitre II. Nous obtenons le chromatogramme représenté par la figure 11.

L'hydrogène n'est pas détecté dans ces conditions opératoires.

a) Identification des pics par comparaison des temps de rétention avec ceux de substances connues.

Par cette méthode en utilisant des substances très pures, nous avons pu établir une correspondance entre certaines de ces substances et les pics suivants :

- pic 3 : acétone
- pic 6 : méthanol
- pic 7 : éthanol
- pic 8 : propanol
- pic 9 : isobutanol
- pic 10 : butanol

b) Identification des pics par couplage de la chromatographie en phase gazeuse et de la spectrométrie de masse.

Cette technique nous a permis de confirmer l'identification de l'acétone, de l'éthanol, du propanol, de l'isobutanol et du butanol.

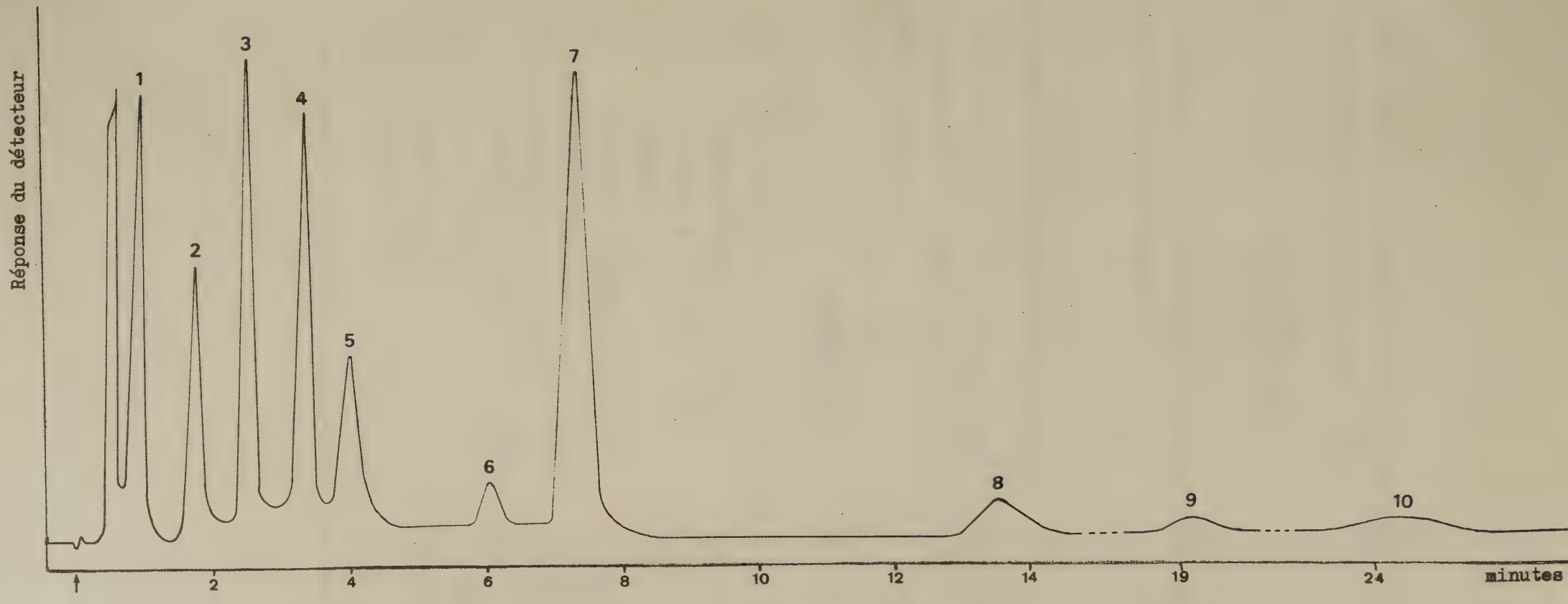


Figure 11 - Chromatogramme des gaz de *Clostridium histolyticum*

1 (x8) : Triméthylamine	4 (x64) : Acétate d'éthyle	7 (x16) : Ethanol	10 (x1) : Butanol
2 (x8) : X	5 (x8) : X	8 (x1) : Prepanol	
3 (x64) : Acétone	6 (x8) : Méthanol	9 (x1) : Isobutanol	

Elle nous a également permis de préciser la nature des composés correspondants aux pics 1 et 4.

- pic 1 : triméthylamine
- pic 4 : acétate d'éthyle

Les pics 2 et 5 n'ont pu être identifiés par aucune des deux techniques utilisées.

5) Evaluation quantitative des composés

Cette évaluation est résumée dans le tableau VI (les nombres correspondent à la surface des pics multipliée par l'atténuation du chromatographe).

TABLEAU VI

Triméthylamine	63
Composé X	31
Acétone	950
Acétate d'éthyle	928
Composé X	35,2
Méthanol	9,6
Ethanol	322
Propanol	1,65
Isobutanol	traces
Butanol	1

Conclusion

Après alcalinisation d'une culture de 5 jours de Clostridium histolyticum, ensemencé sur milieu au thioglycolate de sodium, nous avons pu recueillir 5cm^3 de gaz essentiellement constitués d'hydrogène mais renfermant également de nombreux métabolites volatils. Nous avons constaté la présence de 10 métabolites et identifié 8 d'entre eux : la triméthylamine, l'acétone, l'acétate d'éthyle, le méthanol, l'éthanol, le propanol, l'isobutanol et le butanol.

Clostridium histolyticum se caractérise donc surtout par un très faible dégagement gazeux et une production relativement importante de triméthylamine.

L'hydrogène sulfuré et le méthane-thiol étant déjà fixés par la soude, nous n'avons pas retrouvé, comme C.LABARRE (53), de disulfure de diméthyle.

CLOSTRIDIUM SPOROGENES souche GO I

Cette souche a été isolée en 1945 d'un cas de gangrène putride du gros orteil.

Ce bacille ne possédant pas de pouvoir toxinogène, il n'a pas été effectué d'inoculation sous-cutanée du filtrat de sa culture au cobaye.

1) Culture

Le milieu au thioglycolate de sodium est ensemencé comme pour les germes précédents et l'Erlenmeyer est maintenu à l'étuve à 37º pendant 5 jours.

2) Prélèvement des gaz

Après addition de soude 5N, l'alcalinisation du milieu et la fixation du gaz carbonique étant réalisées, nous procédons à l'extraction des gaz selon le même protocole que pour les germes précédents.

3) Volume total des gaz

Après plusieurs essais le volume total des gaz recueillis est en moyenne de $18cm^3$.

4) Composition des gaz

Nous prélevons, comme précédemment, $2cm^3$ de gaz recueillis sous mercure et nous les injectons dans le chromatographe fonctionnant selon le protocole décrit dans le chapitre II. Nous obtenons le chromatogramme représenté par la figure 12.

L'hydrogène n'est pas détecté dans ces conditions opératoires.

a) Identification des pics par comparaison des temps de rétention à ceux de substances connues.

Par cette méthode, en utilisant des substances très pures, nous avons pu établir une correspondance entre certaines de ces substances et les pics suivants :

- pic 3 : acétone
- pic 6 : méthanol
- pic 7 : isopropanol
- pic 8 : éthanol
- pic 10 : propanol
- pic 11 : isobutanol
- pic 12 : butanol

b) Identification des pics par couplage de la chromatographie en phase gazeuse et de la spectrométrie de masse.

Cette technique nous a permis de confirmer l'identification de l'acétone, de l'éthanol, du propanol, de l'isobutanol et du butanol.

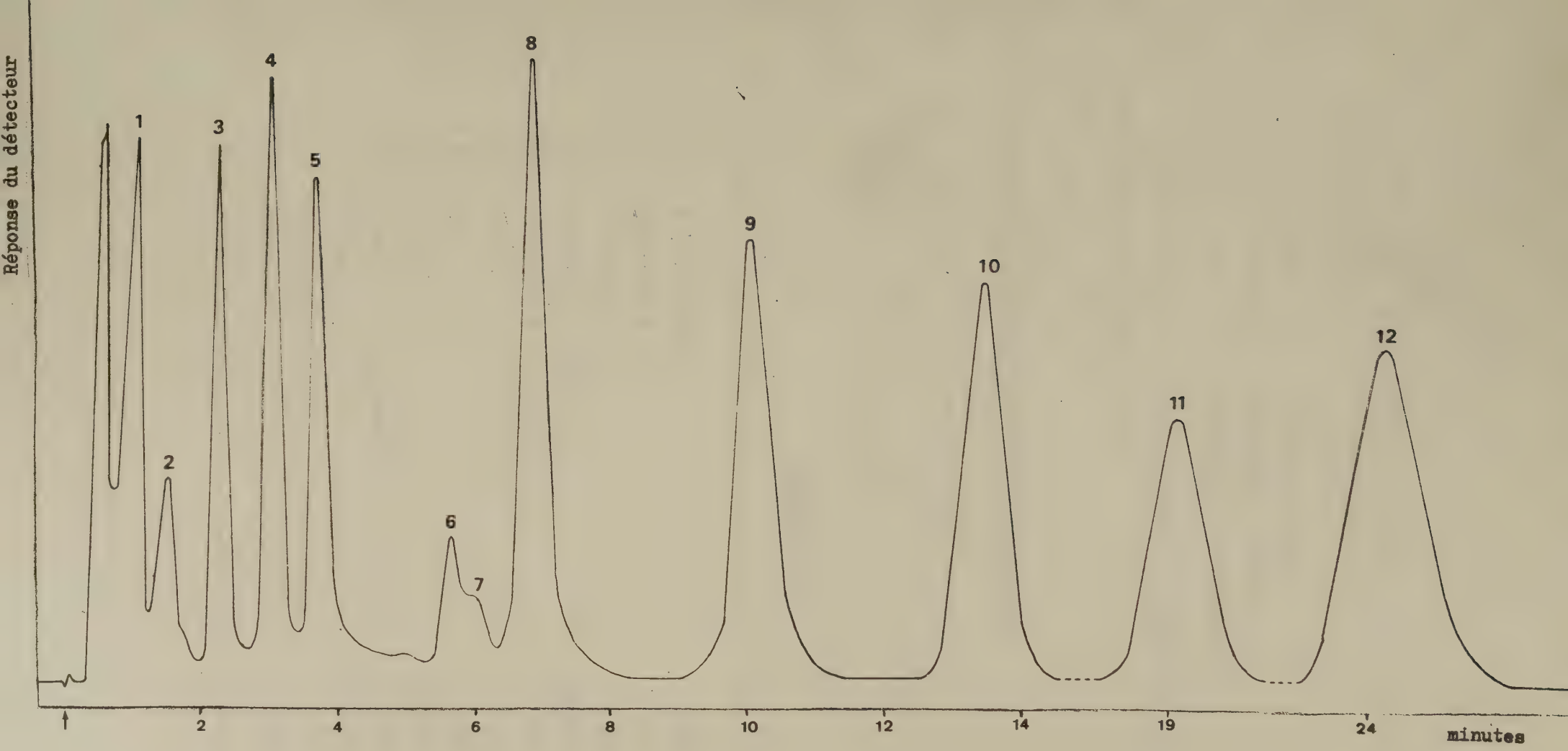


Figure 12 – Chromatogramme des gaz de *Clostridium sporogenes*

1 (×32) : Triméthylamine	4 (×128) : Acétate d'éthyle	7 (×8) : Isopropanol	10 (×16) : Propanol
2 (×8) : X	5 (×8) : X	8 (×256) : Ethanol	11 (×8) : Isobutanol
3 (×32) : Acétone	6 (×8) : Méthanol	9 (×32) : Disulfure de diméthyle	12 (×16) : Butanol

Elle nous a également permis de préciser la nature des composés correspondants aux pics 1, 4 et 9.

- pic 1 : triméthylamine
- pic 4 : acétate d'éthyle
- pic 9 : disulfure de diméthyle

Les pics 2 et 5 n'ont pu être identifiés par aucune des deux techniques utilisées.

5) Evaluation quantitative des composés

Cette évaluation est résumée dans le tableau VII (les nombres correspondent à la surface des pics multipliée par l'atténuation du chromatographe).

TABLEAU VII

Triméthylamine	480
Composé X	27
Acétone	421
Acétate d'éthyle	2688
Composé X	98
Méthanol	30,6
Isopropanol	13
Ethanol	13516
Disulfure de diméthyle	992
Propanol	470
Isobutanol	228
Butanol	878

Conclusion

Après alcalinisation d'une culture de 5 jours de Clostridium sporogenes, ensemencé sur milieu au thioglycolate de sodium, nous avons pu recueillir 18cm^3 de gaz, essentiellement constitués d'hydrogène mais renfermant de nombreux métabolites volatils. Nous avons constaté la présence de 12 métabolites et réalisé l'identification de 10 d'entre eux : la triméthylamine, l'acétone, l'acétate d'éthyle, le méthanol, l'isopropranol, l'éthanol, le disulfure de diméthyle, le propanol, l'isobutanol et le butanol.

Clostridium sporogenes se distingue par une production relativement abondante de ces différents métabolites et tout particulièrement d'éthanol.

CLOSTRIDIUM SORDELLII souche 82

Cette souche a été isolée en 1922 par SORDELLI d'un cas de gangrène putride humaine.

Son pouvoir toxinogène a été vérifié (53) par inoculation sous-cutanée à plusieurs cobayes de 0,1cm^3 de filtrat d'une culture de 48 heures en bouillon VF glucosé. Les cobayes sont morts en 24 heures.

1) Culture

Le milieu au thioglycolate de sodium est ensemencé comme pour les germes précédents et l'Erlenmeyer est maintenu à l'étuve à 37º pendant 5 jours.

2) Prélèvement des gaz

Après addition de soude 5N, l'alcalinisation du milieu et la fixation de gaz carbonique étant réalisées, nous procédons à l'extraction des gaz selon le même protocole que pour les germes précédents.

3) Volume total des gaz

Après plusieurs essais le volume total des gaz recueillis est en moyenne de $20cm^3$.

4) Composition des gaz

Nous prélevons $2cm^3$ de gaz, recueillis sous mercure, comme précédemment et nous les injectons dans le chromatographe fonctionnant selon le protocole décrit dans le chapitre II. Nous obtenons le chromatogramme représenté par la figure 13.

L'hydrogène n'est pas détecté dans ces conditions opératoires.

a) Identification des pics par comparaison des temps de rétention à ceux de substances connues.

Par cette méthode, en utilisant des substances très pures, nous avons pu établir une correspondance entre certaines de ces substances et les pics suivants :

- pic 3 : acétone
- pic 7 : méthanol
- pic 8 : isopropanol
- pic 9 : éthanol
- pic 11 : propanol
- pic 12 : isobutanol
- pic 13 : butanol

b) Identification des pics par couplage de la chromatographie en phase gazeuse et de la spectrométrie de masse.

Cette technique nous a permis de confirmer l'identification de l'acétone, de l'éthanol, du propanol, de l'isobutanol et du butanol.

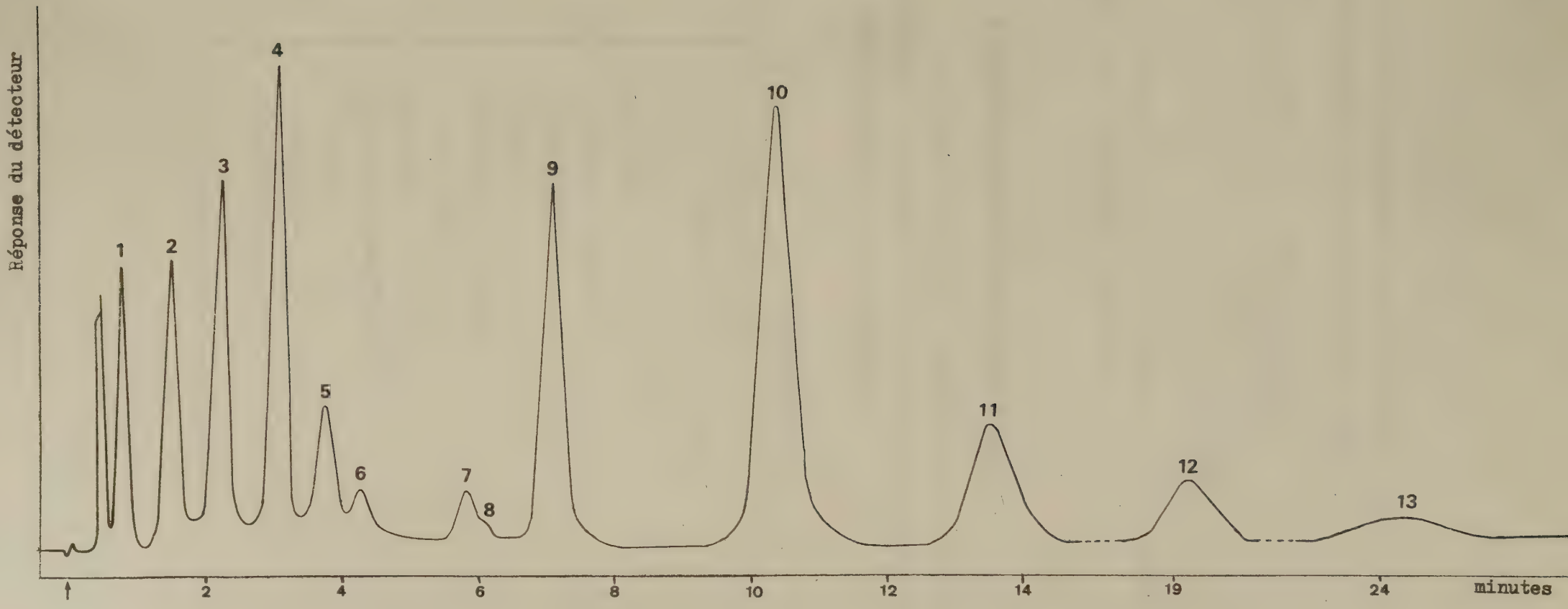


Figure 13 - Chromatogramme des gaz de Clostridium sordellii

1 (x8) : Triméthylamine	4 (x32) : Acétate d'éthyle	7 (x8) : Méthanol	10 (x32) : Disulfure de diméthyle
2 (x8) : X	5 (x8) : X	8 (x8) : Isopropanol	11 (x8) : Propanol
3 (x64) : Acétone	6 (x8) : X	9 (x64) : Ethanol	12 (x1) : Isobutanol
			13 (X1) : Butanol

Elle a également permis de préciser la nature des composés correspondants aux pics 1, 4 et 10.

pic 1 : triméthylamine
pic 4 : acétate d'éthyle
pic 10 : disulfure de diméthyle

Les pics 2, 5 et 6 n'ont pu être identifiés par aucune des deux techniques utilisées.

5) Evaluation quantitative des composés

Cette évaluation est résumée dans le tableau VIII (les nombres correspondent à la surface des pics multipliée par l'atténuation du chromatographe).

TABLEAU VIII

Triméthylamine	36
Composé X	45,6
Acétone	600
Acétate d'éthyle	448
Composé X	21
Composé X	5,7
Méthanol	10,2
Isopropanol	traces
Ethanol	1220
Disulfure de diméthyle	1024
Propanol	72
Isobutanol	9
Butanol	14

Conclusion

Après alcalinisation d'une culture de 5 jours de Clostridium sordellii, ensemencé sur milieu au thiolgycolate de sodium, nous avons pu recueillir 20cm^3 de gaz essentiellement constitués d'hydrogène mais renfermant de nombreux métabolites volatils. Nous avons constaté la présence de 13 métabolites et réalisé l'identification de 10 d'entre eux : la triméthylamine, l'acétone, l'acétate d'éthyle, le méthanol, l'isopropanol, l'éthanol, le disulfure de diméthyle, le propanol, l'isobutanol et le butanol.

Clostridium sordellii se distingue par la présence d'un composé non identifié représenté par le pic 6 non retrouvé dans les gaz des autres germes étudiés.

CLOSTRIDIUM BIFERMENTANS souche TM

Cette souche a été isolée en 1902 par TISSIER et MARTELLY à partir d'une viande de boucherie.

Ce bacille ne possédant pas de pouvoir toxinogène, il n'a pas été effectué d'inoculation sous-cutanée d'un filtrat de culture au cobaye.

1) Culture

Le milieu au thioglycolate de sodium est ensemencé comme pour les germes précédents et l'Erlenmeyer est maintenu à l'étuve à 37º pendant 5 jours.

2) Prélèvement des gaz

Après addition de soude 5N, l'alcalinisation du milieu et la fixation de gaz carbonique étant réalisées, nous procédons à l'extraction des gaz selon le même protocole que pour les germes précédents.

3) Volume total des gaz

Après plusieurs essais le volume total des gaz recueillis est en moyenne de $22cm^3$.

4) Composition des gaz

Nous prélevons, comme précédemment, $2cm^3$ de gaz recueillis sous mercure et nous les injectons dans le chromatographe fonctionnant selon le protocole décrit dans le chapitre II. Nous obtenons le chromatogramme représenté par la figure 14.

L'hydrogène n'est pas détecté dans ces conditions opératoires.

a) Identification des pics par comparaison des temps de rétention à ceux de substances connues.

Par cette méthode, en utilisant des substances très pures, nous avons pu établir une correspondance entre certaines de ces substances et les pics suivants :

- pic 3 : acétone
- pic 6 : méthanol
- pic 7 : isopropanol
- pic 8 : éthanol
- pic 10 : propanol
- pic 11 : isobutanol
- pic 12 : butanol

b) Identification des pics par couplage de la chromatographie en phase gazeuse et de la spectrométrie de masse.

Cette technique nous a permis de confirmer l'identification de l'acétone, de l'éthanol, du propanol, de l'isobutanol et du butanol.

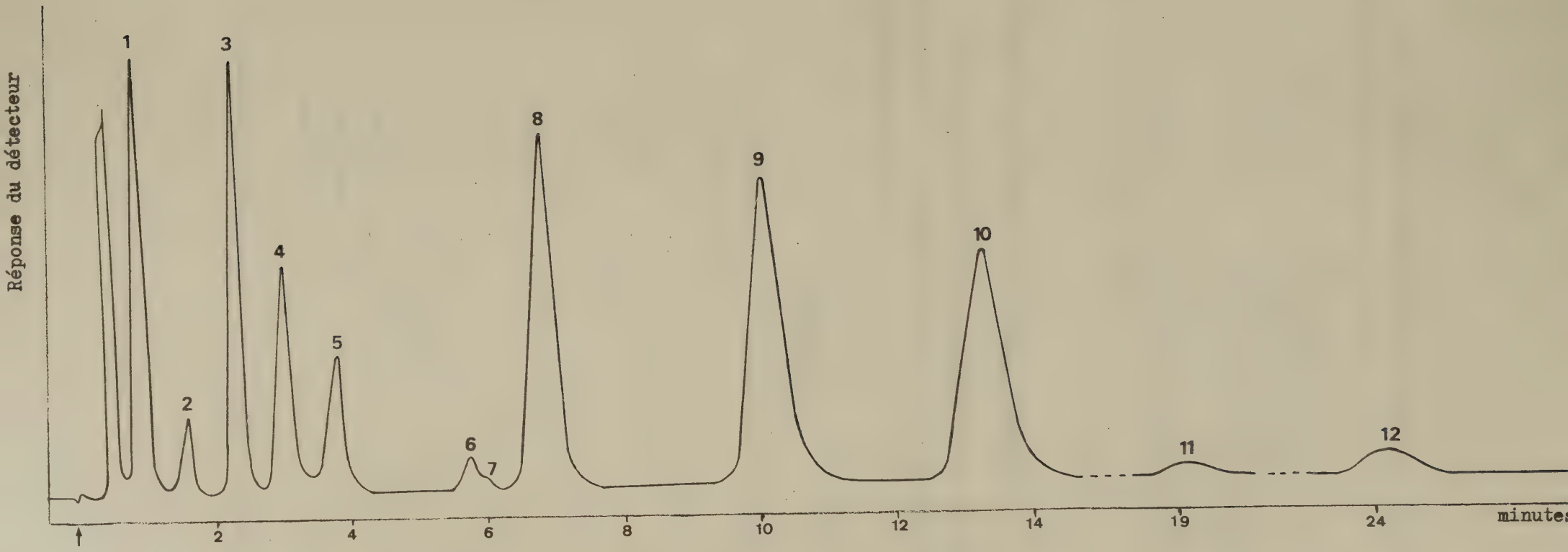


Figure 14 – Chromatogramme des gaz de *Clostridium bifermentans*

1 (×16) : Triméthylamine	4 (×128) : Acétate d'éthyle	7 (×8) : Isopropanol	10 (×16) : Propanol
2 (×16) : X	5 (×8) : X	8 (×256) : Ethanol	11 (×8) : Isobutanol
3 (×16) : Acétone	6 (×8) : Méthanol	9 (×64) : Disulfure de diméthyle	12 (×8) : Butanol

Elle nous a permis de préciser la nature des composés correspondants aux pics 1, 4 et 9.

- pic 1 : triméthylamine
- pic 4 : acétate d'éthyle
- pic 9 : disulfure de diméthyle

Les pics 2 et 5 n'ont pu être identifiés par aucune des deux techniques utilisées.

5) Evaluation quantitative des composés

Cette évaluation est résumée dans le tableau IX (les nombres correspondent à la surface des pics multipliée par l'atténuation du chromatographe).

TABLEAU IX

Triméthylamine	100
Composé X	21,6
Acétone	180
Acétate d'éthyle	972
Composé X	16
Méthanol	4,3
Isopropanol	traces
Ethanol	6450
Disulfure de diméthyle	1408
Propanol	264
Isobutanol	5
Butanol	25

Conclusion

Après alcalinisation d'une culture de 5 jours de Clostridium bifermentans, ensemencé sur milieu au thioglycolate de sodium, nous avons pu recueillir 22cm^3 de gaz essentiellement constitués d'hydrogène mais renfermant de nombreux métabolites volatils. Nous avons constaté la présence de 12 métabolites et réalisé l'identification de 10 d'entre eux : la triméthylamine, l'acétone, l'acétate d'éthyle, le méthanol, l'isopropanol, l'éthanol, le disulfure de diméthyle, le propanol, l'isobutanol et le butanol.

Dans le cadre de la différenciation entre Clostridium bifermentans et Clostridium sordellii (27) on peut noter, en dehors de la présence d'un composé supplémentaire, représenté par le pic 6, pour Clostridium sordellii, une production d'éthanol nettement supérieure pour Clostridium bifermentans.

CLOSTRIDIUM AEROFOETIDUM souche WS

Cette souche a été découverte en 1917 par WEINBERG et SEGUIN dans les plaies de guerre gangréneuses.

Ce bacille ne possédant pas de pouvoir toxinogène il n'a pas été effectué d'inoculation sous-cutanée de filtrat de sa culture au cobaye.

1) Culture

Le milieu au thioglycolate de sodium est ensemencé comme pour les germes précédents et l'Erlenmeyer est maintenu à l'étuve à 37º pendant 5 jours.

2) Prélèvement des gaz

Après addition de soude 5N, l'alcalinisation du milieu et la fixation de gaz carbonique étant réalisées, nous procédons à l'extraction des gaz selon le même protocole que pour les germes précédents.

3) Volume total des gaz

Après plusieurs essais le volume total des gaz recueillis est en moyenne de $62cm^3$.

4) Composition des gaz

Nous prélevons, comme précédemment, $2cm^3$ de gaz recueillis sous mercure et nous les injectons dans le chromatographe fonctionnant selon le protocole décrit dans le chapitre II. Nous obtenons le chromatogramme représenté par la figure 15.

L'hydrogène n'est pas détecté dans ces conditions opératoires.

a) Identification des pics par comparaison des temps de rétention à ceux de substances connues.

Par cette méthode, en utilisant des substances très pures, nous avons pu établir une correspondance entre certaines de ces substances et les pics suivants :

- pic 3 : acétone
- pic 6 : méthanol
- pic 7 : éthanol
- pic 10 : propanol
- pic 12 : isobutanol
- pic 13 : butanol

b) Identification des pics par couplage de la chromatographie en phase gazeuse et de la spectrométrie de masse.

Cette technique nous a permis de confirmer l'identification de l'acétone, du propanol, de l'isobutanol et du butanol.

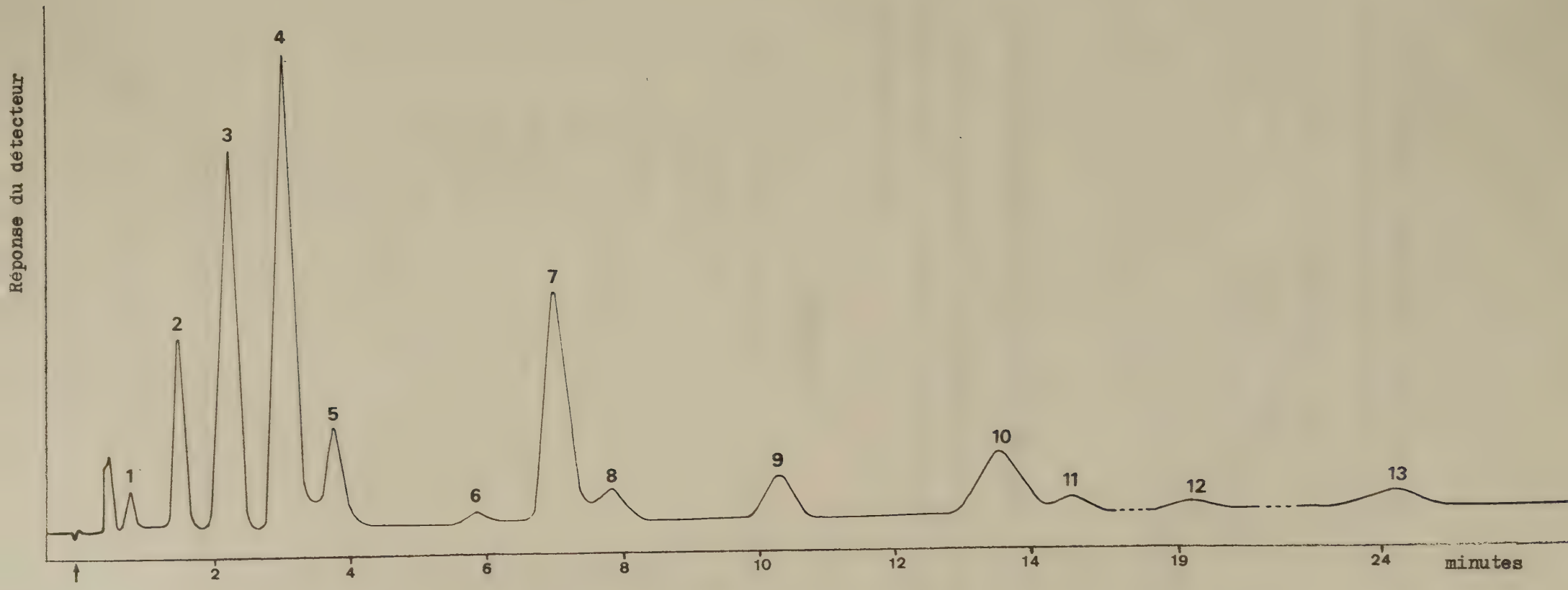


Figure 15 - Chromatogramme des gaz de Clostridium aerofoetidum

1 (x8) : Triméthylamine	4 (x16) : Acétate d'éthyle	7 (x8) : Ethanol	10 (x1) : Propanol
2 (x8) : X	5 (x8) : X	8 (x8) : X	11 (x1) : X
3 (x32) : Acétone	6 (x8) : Méthanol	9 (x1) : Disulfure de diméthyle	12 (x1) : Isobutanol
			13 (x1) : Butanol

Elle nous a également permis de préciser la nature des composés correspondants aux pics 1, 4 et 9.

- pic 1 : triméthylamine
- pic 4 : acétate d'éthyle
- pic 9 : disulfure de diméthyle

Les pics 2, 5, 8 et 11 n'ont pu être identifiés par aucune des deux techniques utilisées.

5) Evaluation quantitative des composés

Cette évaluation est résumée dans le tableau X (les nombres correspondent à la surface des pics multipliée par l'atténuation du chromatographe).

TABLEAU X

Triméthylamine	4
Composé X	24,5
Acétone	264
Acétate d'éthyle	194
Composé X	8,25
Méthanol	1,6
Ethanol	46
Composé X	8,8
Disulfure de diméthyle	2
Propanol	3,3
Composé X	1
Isobutanol	traces
Butanol	1,1

Conclusion

Après alcalinisation d'une culture de 5 jours de Clostridium aerofoetidum, ensemencé sur milieu au thioglycolate de sodium, nous avons pu recueillir 62cm^3 de gaz, essentiellement constitués d'hydrogène mais renfermant de nombreux métabolites volatils. Nous avons constaté la présence de 13 métabolites et réalisé l'identification de 9 d'entre eux : la triméthylamine, l'acétone, l'acétate d'éthyle, le méthanol, l'éthanol, le disulfure de diméthyle, le propanol, l'isobutanol et le butanol.

Par rapport aux autres germes étudiés, on retrouve deux autres composés non identifiés qui constituent une différenciation supplémentaire pour Clostridium aerofoetidum.

CLOSTRIDIUM FALLAX souche TRACOL

Cette souche a été isolée en 1917 par WEINBERG et SEGUIN d'un cas de gangrène gazeuse bénigne chez un blessé nommé TRACOL.

Le faible pouvoir toxinogène de Clostridium fallax n'a pas été vérifié.

1) Culture

Le milieu au thioglycolate de sodium est ensemencé comme pour les germes précédents et l'Erlenmeyer est maintenu à l'étuve à 37º pendant 5 jours.

2) Prélèvement des gaz

Après addition de soude 5N, l'alcalinisation du milieu et la fixation du gaz carbonique étant réalisées, nous procédons à l'extraction des gaz selon le même protocole que pour les germes précédents.

3) Volume total des gaz

Après plusieurs essais le volume total des gaz recueillis est en moyenne de 71cm^3.

4) Composition des gaz

Nous prélevons, comme précédemment, 2cm^3 de gaz recueillis sous mercure et nous les injectons dans le chromatographe fonctionnant selon le protocole décrit dans le chapitre II. Nous obtenons le chromatogramme représenté par la figure 16.

L'hydrogène n'est pas détecté dans ces conditions opératoires.

a) Identification des pics par comparaison des temps de rétention à ceux de substances connues.

Par cette méthode, en utilisant des substances très pures, nous avons pu établir une correspondance entre certaines de ces substances et les pics suivants :

- pic 3 : acétone
- pic 6 : méthanol
- pic 7 : éthanol
- pic 9 : propanol
- pic 11 : isobutanol
- pic 12 : butanol

b) Identification des pics par couplage de la chromatographie en phase gazeuse et de la spectrométrie de masse.

Cette technique nous a permis de confirmer l'identification de l'acétone, de l'éthanol, du propanol, de l'isobutanol et du butanol.

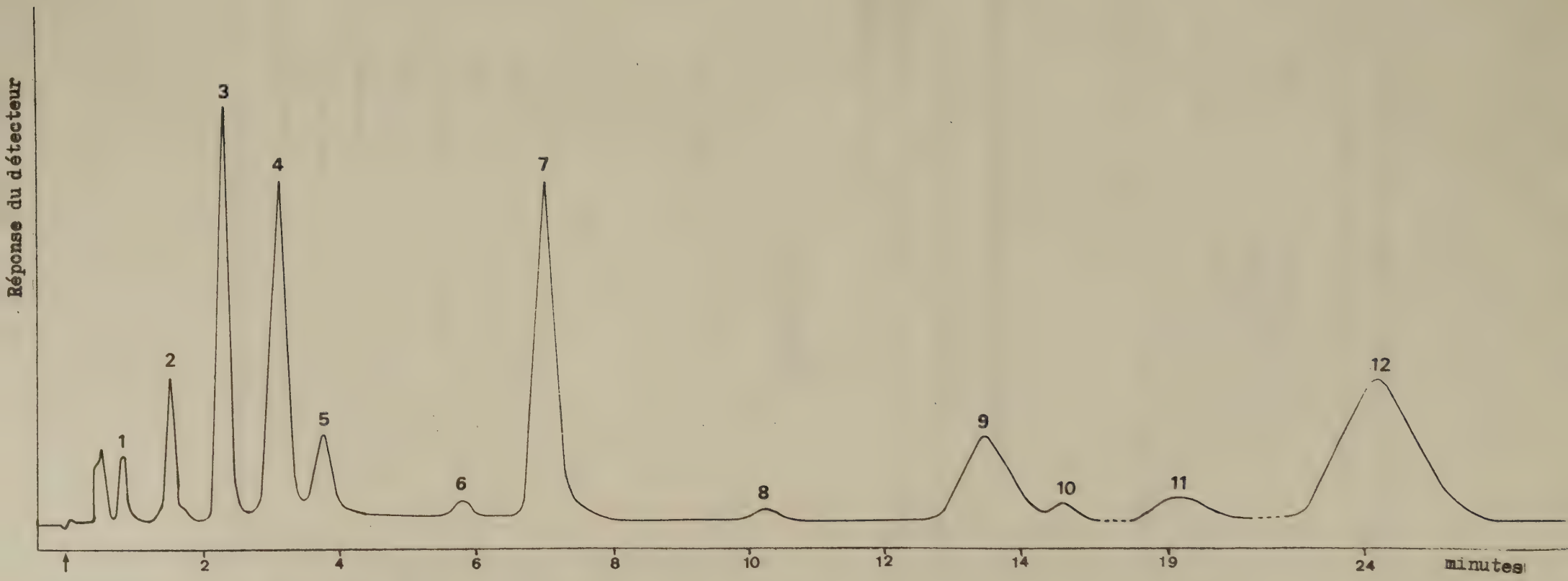


Figure 16 - Chromatogramme des gaz de Clostridium fallax

1 (x8) : Triméthylamine	4 (x16) : Acétate d'éthyle	7 (x8) : Ethanol	10 (x1) : X
2 (x8) : X	5 (x8) : X	8 (x1) : Disulfure de diméthyle	11 (x1) : Isobutanol
3 (64) : Acétone	6 (x8) : Méthanol	9 (x1) : Propanol	12 (x1) : Butanol

Elle nous a également permis de préciser la nature des composés correspondants aux pics 1, 4 et 8.

- pic 1 : triméthylamine
- pic 4 : acétate d'éthyle
- pic 8 : disulfure de diméthyle

Les pics 2, 5 et 10 n'ont pu être identifiés par aucune des deux techniques utilisées.

5) Evaluation quantitative des composés

Cette évaluation est résumée dans le tableau XI (les nombres correspondent à la surface des pics multipliée par l'atténuation du chromatographe).

TABLEAU XI

Triméthylamine	6,2
Composé X	14
Acétone	727
Acétate d'éthyle	128
Composé X	6,7
Méthanol	2,6
Ethanol	94
Disulfure de diméthyle	1
Propanol	3,75
Composé X	1,1
Isobutanol	1,4
Butanol	17,5

Conclusion

Après alcalinisation d'une culture de 5 jours de Clostridium fallax, ensemencé sur milieu au thioglycolate de sodium, nous avons pu recueillir 71cm^3 de gaz essentiellement constitués d'hydrogène mais renfermant de nombreux métabolites volatils. Nous avons constaté la présence de 12 métabolites et réalisé l'identification de 9 d'entre eux : la triméthylamine, l'acétone, l'acétate d'éthyle, le méthanol, l'éthanol, le disulfure de diméthyle, le propanol, l'isobutanol et le butanol.

Après le propanol, nous retrouvons pour Clostridium fallax, un troisième composé non identifié qui présente le même temps de rétention qu'un des composés déjà retrouvé dans les gaz de Clostridium aerofoetidum.

PLECTRIDIUM PUTRIFICUM souche BIENSTOCK 1905

Cette souche a été isolée en 1905 par BIENSTOCK. Ce bacille ne possédant pas de pouvoir toxinogène, il n'a pas été effectué d'inoculation sous-cutanée d'un filtrat de culture au cobaye.

1) Culture

Le milieu au thioglycolate de sodium est ensemencé comme pour les germes précédents et l'Erlenmeyer est maintenu à l'étuve à 37º pendant 5 jours.

2) Prélèvement des gaz

Après addition de soude 5N, l'alcalinisation du milieu et la fixation du gaz carbonique étant réalisées, nous procédons à l'extraction des gaz selon le même protocole que pour les germes précédents.

3) Volume total des gaz

Après plusieurs essais le volume total des gaz recueillis est en moyenne de 19cm^3.

4) Composition des gaz

Nous prélevons, comme précédemment, 2cm^3 de gaz recueillis sous mercure et nous les injectons dans le chromatographe fonctionnant selon le protocole décrit dans le chapitre II. Nous obtenons le chromatogramme représenté par la figure 17.

L'hydrogène n'est pas détecté dans ces conditions opératoires.

a) Identification des pics par comparaison des temps de rétention à ceux de substances connues.

Par cette méthode, en utilisant des substances très pures, nous avons pu établir une correspondance entre certaines de ces substances et les pics suivants :

- pic 3 : acétone
- pic 6 : méthanol
- pic 7 : isopropanol
- pic 8 : éthanol
- pic 10 : propanol
- pic 11 : isobutanol
- pic 12 : butanol

b) Identification des pics par couplage de la chromatographie en phase gazeuse et de la spectrométrie de masse.

Cette technique nous a permis de confirmer l'identification de l'acétone, de l'éthanol, du propanol, de l'isobutanol et du butanol.

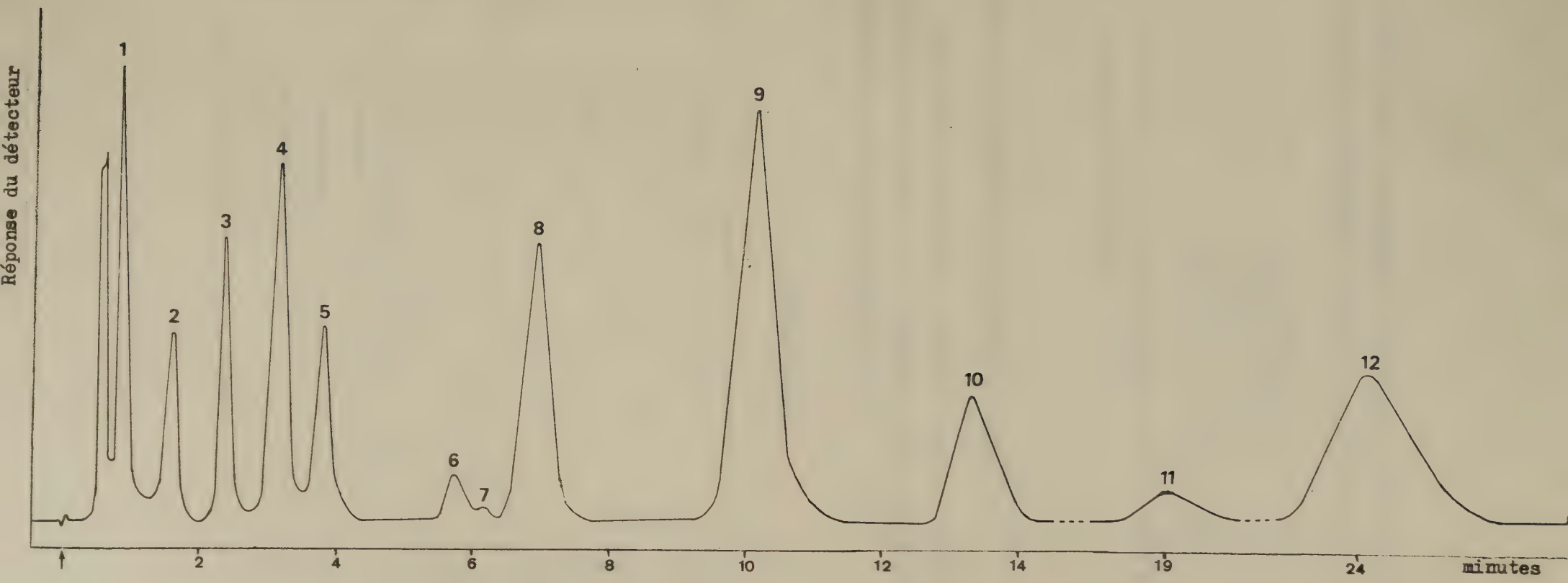


Figure 17 - Chromatogramme des gaz de Plectridium putrificum

1 (x8) : Triméthylamine	4 (x64) : Acétate d'éthyle	7 (x8) : Isopropanol	10 (x8) : Propanol
2 (x8) : X	5 (x8) : X	8 (x256): Ethanol	11 (x8) : Isobutanol
3 (x32) : Acétone	6 (x8) : Méthanol	9 (x32) : Disulfure de diméthyle	12 (x8) : Butanol

Elle nous a également permis de préciser la nature des composés correspondants aux pics 1, 4 et 9.

- pic 1 : triméthylamine
- pic 4 : acétate d'éthyle
- pic 9 : disulfure de diméthyle

Les pics 2 et 5 n'ont pu être identifiés par aucune des deux techniques utilisées.

5) Evaluation quantitative des composés

Cette évaluation est résumée dans le tableau XII (les nombres correspondent à la surface des pics multipliée par l'atténuation du chromatographe).

TABLEAU XII

Triméthylamine	92
Composé X	25
Acétone	184
Acétate d'éthyle	537
Composé X	30,4
Méthanol	14,2
Isopropanol	0,5
Ethanol	4660
Disulfure de diméthyle	928
Propanol	74
Isobutanol	23
Butanol	166

Conclusion

Après alcalinisation d'une culture de 5 jours de Plectridium putrificum, ensemencé sur milieu au thioglycolate de sodium nous avons pu recueillir 19cm^3 de gaz, essentiellement constitués d'hydrogène mais renfermant de nombreux métabolites volatils. Nous avons constaté la présence de 12 métabolites et identifié 10 d'entre eux : la triméthylamine, l'acétone, l'acétate d'éthyle le méthanol, l'isopropanol, l'éthanol, le disulfure de diméthyle, le propanol, l'isobutanol et le butanol.

La production d'isobutanol et de butanol par Plectridium putrificum, tout en étant inférieure à celle de Clostridium sporogenes, distingue ce germe des autres germes étudiés.

CHAPITRE IV

ETUDE COMPARATIVE DES RESULTATS OBTENUS

Tous les bacilles ayant été étudiés suivant le même protocole expérimental, nous avons pu établir entre eux une comparaison sur deux plans : celui du volume gazeux total et celui de la composition des gaz.

- Volume gazeux total

La première partie de nos essais, c'est-à-dire le recueil des gaz, nous permet de constater, en tenant compte de la fixation du gaz carbonique après addition de soude 5N, une similitude avec les résultats obtenus par C.LABARRE (53). L'importance du volume des gaz recueillis nous permet également de classer les 11 bactéries anaérobies étudiées en trois groupes :

. Le premier groupe dont le volume est de l'ordre de 60 à 80ml comprend :

- Welchia perfringens 82cm^3
- Clostridium fallax 71cm^3
- Clostridium septicum 64cm^3
- Clostridium aerofoetidum 62cm^3
- Clostridium chauvoei 59cm^3

- Le deuxième groupe dont le volume est de l'ordre de 10 à 20cm^3 est formé des germes suivants :

  - Clostridium bifermentans 22cm^3
  - Clostridium sordellii 20cm^3
  - Plectridium putrificum 19cm^3
  - Clostridium sporogenes 18cm^3
  - Clostridium oedematiens 11cm^3

- Le troisième groupe dont le volume est inférieur à 10cm^3 est constitué exclusivement de

  - Clostridium histolyticum 5cm^3

- Composition des gaz

La composition des gaz produits par les 11 bacilles est résumée dans le tableau XIII. Ce tableau ne comporte que l'évaluation quantitative des deux composés non identifiés présentant le même temps de rétention pour les 11 germes étudiés, les autres composés non identifiés des gaz de Clostridium sordellii, Clostridium fallax et Clostridium aerofaetidum ne figurent pas dans ce tableau récapitulatif. Les valeurs inscrites sur ce tableau résultent de la multiplication de la surface du pic par l'atténuation du chromatographe.

D'une façon générale, les bactéries du 2ème groupe produisent une quantité relativement importante de métabolites volatils. Ce phénomène est dû en partie à la concentration de ces métabolites dans un volume de gaz plus faible, le gaz carbonique ayant été fixé, mais surtout à un métabolisme glucidique plus actif pour les souches appartenant à ce groupe.

. Le deuxième groupe dont le volume est de l'ordre de 10 à 20cm^3 est formé des germes suivants :

- Clostridium bifermentans 22cm^3
- Clostridium sordellii 20cm^3
- Plectridium putrificum 19cm^3
- Clostridium sporogenes 18cm^3
- Clostridium oedematiens 11cm^3

. Le troisième groupe dont le volume est inférieur à 10cm^3 est constitué exclusivement de

- Clostridium histolyticum 5cm^3

- Composition des gaz

La composition des gaz produits par les 11 bacilles est résumée dans le tableau XIII. Ce tableau ne comporte que l'évaluation quantitative des deux composés non identifiés présentant le même temps de rétention pour les 11 germes étudiés, les autres composés non identifiés des gaz de Clostridium sordellii, Clostridium fallax et Clostridium aerofaetidum ne figurent pas dans ce tableau récapitulatif. Les valeurs inscrites sur ce tableau résultent de la multiplication de la surface du pic par l'atténuation du chromatographe.

D'une façon générale, les bactéries du 2ème groupe produisent une quantité relativement importante de métabolites volatils. Ce phénomène est dû en partie à la concentration de ces métabolites dans un volume de gaz plus faible, le gaz carbonique ayant été fixé, mais surtout à un métabolisme glucidique plus actif pour les souches appartenant à ce groupe.

TABLEAU XIII - Comparaison quantitative des différents composés volatils produits par les 11 bactéries anaérobies étudiées.

	Triméthyl amine	X	Acétone	Acétate d'éthyle	X	Méthanol	Isopropanol	Ethanol	Disulfure de diméthyle	Propanol	Isobutanol	Butanol	Acétate d'éthyle / Ethanol	Volume total
W. perfringens	2,2	14,5	320	279	8	1,4	0	211	0	1,1	Traces	2	1,32	82
Cl.septicum	2,2	32	345	241	7,5	2,4	Traces	485	0	3	0,60	4,5	0,50	64
Cl.chauvoei	1	25	50	91	4	2	0	142	0	0,5	Traces	2,7	0,64	59
Cl.fallax	6,2	14	727	128	6,72	2,6	0	94	1	3,75	1,4	17,5	1,35	71
Cl.aerofoetidum	4	24,5	264	194	8,25	1,6	0	46	2	3,3	Traces	1,1	4,21	62
Cl.sporogenes	480	27	421	2688	98	30,6	13	13516	992	470	228	878	1,98	18
Cl.bifermentans	100	21,6	180	972	16	4,3	Traces	6450	1408	264	5	25	1,50	22
Pl.putrificum	92	25	184	537	30,4	14,2	0,5	4660	928	74	23	166	1,15	19
Cl.sordellii	36	45,6	600	448	21	10,2	Traces	1220	1024	72	9	14	0,36	20
Cl.oedematiens	18,5	58,6	1241	736	36,4	34,4	Traces	144	1056	11	1	1,25	5,11	11
Cl.histolyticum	63	31	950	928	35,2	9,6	0	322	0	1,65	Traces	1	2,57	5

Clotridium histolyticum, seul représentant du 3ème groupe, produit un très faible volume de gaz total ; cependant, il se différencie également par une production assez faible de métabolites comme les alcools.

Dans le cadre du premier groupe, Clostridium fallax et Aerofoetidum se distinguent par la présence d'un pic supplémentaire commun situé entre le propanol et l'isobutanol.

L'étude détaillée de ce tableau XIII nous permet de constater que :

- la triméthylamine est faiblement produite par les bactéries du ler groupe quoique Clostridium fallax et aerofoetidum se distinguent encore par une production légèrement supérieure à celle des autres bactéries de ce groupe. La triméthylamine est surtout formée par les bactéries du second groupe et tout particulièrement par Clostridium sporogenes, bifermentans et Plectridium putrificum. Clostridium histolyticum, seul représentant du 3ème groupe, en libère une quantité relativement abondante, ce qui confirme l'importance de son métabolisme protidique.

- l'acétone est retrouvée en quantité relativement élevée pour des bactéries comme Clostridium histolyticum, oedematiens et sordellii dont le volume de gaz total est faible mais également pour Clostridium fallax et à un moindre degré pour Welchia perfringens et Clostridium septicum.

- l'acétate d'éthyle dépend pour sa formation de la production d'acide acétique que nous n'avons pas étudié dans ce travail et de celle de l'éthanol représenté par le pic 8 de nos chromatogrammes. Le rapport de l'acétate d'éthyle sur l'éthanol permet de situer l'importance de la production d'acide acétique par les bactéries et d'apporter un élément supplémentaire de différenciation de ces mêmes bactéries.

- la concentration du méthanol est sensiblement en rapport avec le volume gazeux total des bactéries sauf pour Clostridium bifermentans qui en forme une quantité relativement faible.

- l'isopropanol est formé par 6 souches, particulièrement par Clostridium sporogenes, et semble être totalement absent dans les gaz de 5 souches : Welchia perfringens, Clostridium chauvoei, fallax, aerofoetidium et histolyticum.

- l'éthanol que l'on peut considérer comme le composé essentiel du métabolisme glucidique est surtout produit en quantité relativement importante par les bactéries du second groupe à l'exception de Clostridium oedematiens.

- le disulfure de diméthyle est le seul composé soufré que l'on a retrouvé après addition de soude 5N. Ce composé est présent dans les gaz de 7 souches produisant également de l'hydrogène sulfuré et du méthane-thiol(53) mais il parait absent dans les gaz de 4 souches: Welchia perfringens, Clostridium septicum, chauvoei et histolyticum. Si sa production est du même ordre de grandeur et assez importante pour les bactéries du second groupe, il n'en est pas de même pour Clostridium fallax et aerofoetidum dont la production est très faible.

- l'importance de la production du propanol est surtout marquée par les bactéries du second groupe à l'exception de Clostridium oedematiens.

- l'isobutanol apparaît comme un métabolite mineur pour toutes les souches sauf pour Clostridium sporogenes et Plectridium putrificum

- le butanol représente un métabolite important pour les bactéries du second groupe et surtout pour Clostridium sporogenes et Plectridium putrificum mais se retrouve également en quantité relativement élevée pour Clostridium fallax.

Nous pouvons ainsi considérer que :

- Dans le premier groupe , Clostridium fallax et aerofoetidum se distinguent par une production légèrement plus marquée de triméthylamine, la formation de disulfure de diméthyle et d'une substance représentée par un pic supplémentaire entre le propanol et l'isobutanol.

- Dans le second groupe , Clostridium oedematiens forme une quantité assez faible de métabolites en dehors de l'acétone et du disulfure de diméthyle tandis que Clostridium sporogenes apparaît nettement comme la bactérie dont la production de métabolites est la plus importante.

Ainsi le tableau XIII établissant une évaluation quantitative des métabolites produits permet de faire apparaître une différenciation pour les 11 bactéries étudiées.

C H A P I T R E V

METABOLITES IDENTIFIES ET METABOLISME DES ANAEROBIES

La majorité des métabolites que nous avons pu identifier provient du métabolisme glucidique. En effet, la fermentation du glucose par la voie d'Embden-Meyerhof conduit, en dehors et au lieu de l'acide lactique et autres acides organiques, à des substances très diverses. Ce type de fermentation est essentiellement caractérisé par le fait que le pyruvate provenant du tronc commun de la glycolyse est oxydé par décarboxylation oxydative.

$$CH_3\text{-}CO\text{-}COOH \longrightarrow CH_3\text{-}COOH + CO_2 + {}_2H^+$$

Les électrons provenant de l'oxydation anaérobie du pyruvate ont un niveau énergétique très élevé et sont éliminés sous forme d'hydrogène moléculaire grâce à l'hydrogénase des bactéries anaérobies.

$$2\ H^+ + 2\ e \longrightarrow H_2$$

C H A P I T R E V

METABOLITES IDENTIFIES ET METABOLISME DES ANAEROBIES

La majorité des métabolites que nous avons pu identifier provient du métabolisme glucidique. En effet, la fermentation du glucose par la voie d'Embden-Meyerhof conduit, en dehors et au lieu de l'acide lactique et autres acides organiques, à des substances très diverses. Ce type de fermentation est essentiellement caractérisé par le fait que le pyruvate provenant du tronc commun de la glycolyse est oxydé par décarboxylation oxydative.

$$CH_3\text{-}CO\text{-}COOH \longrightarrow CH_3\text{-}COOH + CO_2 + {}_2H^+$$

Les électrons provenant de l'oxydation anaérobie du pyruvate ont un niveau énergétique très élevé et sont éliminés sous forme d'hydrogène moléculaire grâce à l'hydrogénase des bactéries anaérobies.

$$2\ H^+ + 2\ e \longrightarrow H_2$$

On retrouve ainsi le gaz carbonique et l'hydrogène qui constituent la quasi totalité des gaz produits par les bactéries anaérobies.

Le pyruvate ne conduit pas à l'acétate libre mais,d'une part,à l'acétyl coenzyme A dont la condensation conduit à la formation de composés divers et, d'autre part, à l'acétyl phosphate dont la réduction conduit à l'éthanol.

Comme le montre le tableau XIV établi par WOOD (113) en 1961, le pyruvate peut également conduire par la voie de l'acétaldéhyde à la formation d'éthanol,acétoïne et 2-3 butanediol.

Nous retrouvons dans ce tableau 4 des métabolites que nous avons identifiés : l'acétone, l'éthanol, l'isopropanol et le butanol. En ce qui concerne les autres métabolites identifiés, nous pouvons émettre les hypothèses suivantes :

- le méthanol serait produit à partir du formate dont certains auteurs admettent la production en faible quantité lors de la fermentation du glucose par les bactéries anaérobies.

- le propanol, comme dans le cas du butanol, proviendrait d'une réduction de l'acide propionique que l'on retrouve dans le tableau établi par WOOD.

- l'isobutanol proviendrait :

  . soit de la réduction de l'acide isobutyrique produit par les Clostridium (93),

  . soit d'une déshydratation suivie d'une réduction du 2-3 butanediol.

- l'acétate d'éthyle se formerait à partir de l'acide acétique et de l'éthanol.

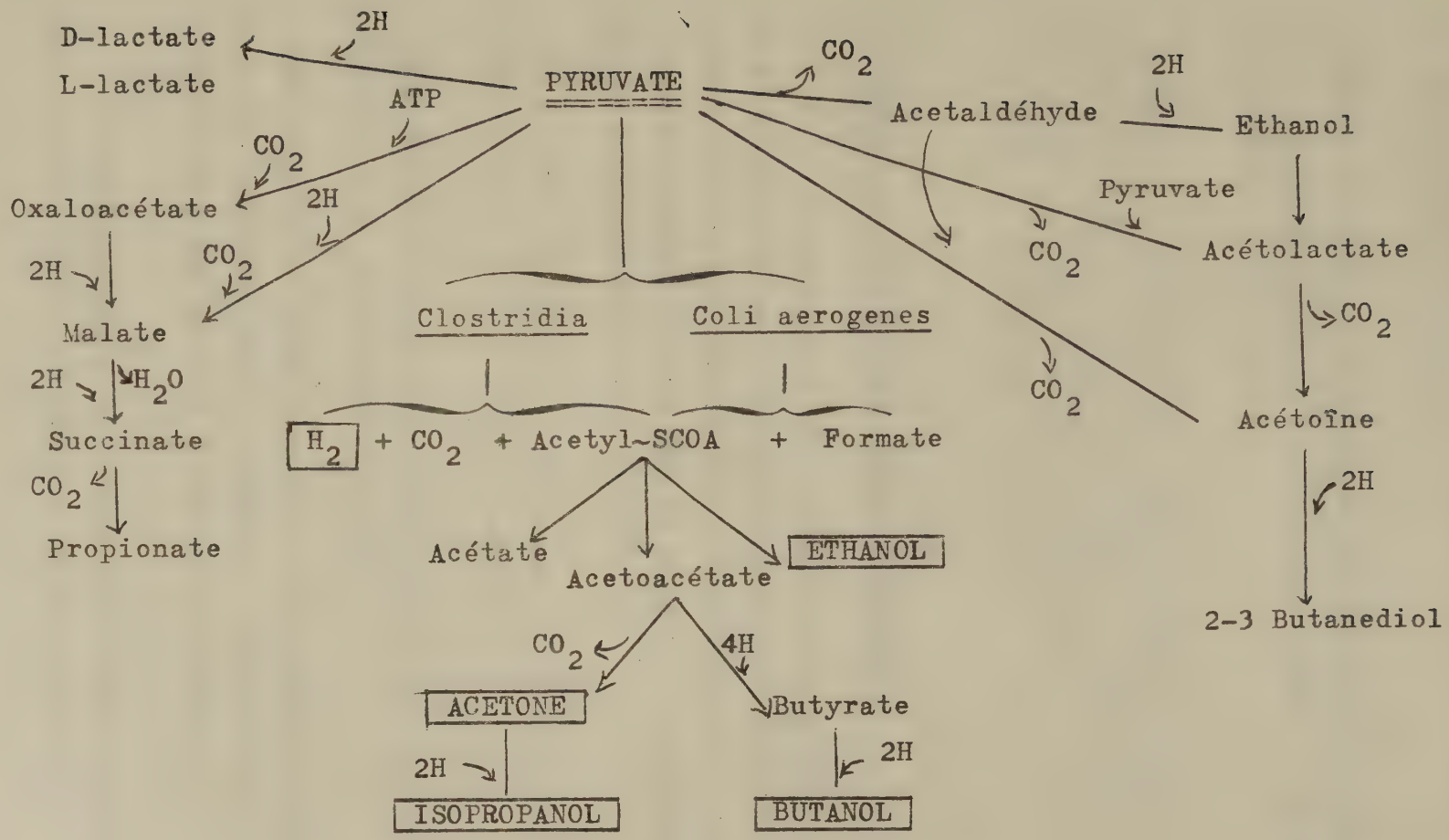


Tableau XIV -Produits de la fermentation du Pyruvate d'après W.A.WOOD (1961)

- la triméthylamine et le disulfure de diméthyle proviennent du métabolisme protidique.

- Ayant effectué l'extraction des gaz après addition de soude 5N, nous n'avons naturellement pas décelé la présence d'acides organiques volatils.

- L'absence d'acétoïne et de 2-3 butanediol sur nos chromatogrammes pourrait s'expliquer par la faible volatilité de ces substances et surtout pour l'acétoïne par l'utilisation d'un détecteur à ionisation de flamme.

Utilisation d'un milieu privé de glucides

En utilisant un milieu de culture constitué exclusivement de Trypticase dans l'eau distillée et en maintenant toutes les autres conditions opératoires, nous avons pu constater pour les 9 souches ayant cultivé sur ce milieu (Cl. chauvoei et oedematiens ne s'étant pas développés) :

- un volume total de gaz nettement inférieur à celui recueilli après culture sur le milieu complet,

- une disparition de certains métabolites, en particulier du butanol, pour toutes ces souches,

- une diminution très importante des autres métabolites lorsqu'ils sont présents parmi lesquels l'éthanol qui est resté présent dans les gaz de toutes les souches.

Le développement de 9 espèces de bactéries anaérobies dans un tel milieu s'explique de deux façons :

- Certaines espèces réalisent une désamination couplée, la réaction de STICKLAND (93), dans laquelle certains acides aminés sont donateurs et d'autres accepteurs d'hydrogène. L'amino acide donateur est désaminé par une déshydrogénase à NAD dont le coenzyme réduit sert à son tour de donateur pour la désamination réductive du second acide aminé.

- Les espèces qui ne réalisent pas la réaction de STICKLAND possèdent une L glutamique déshydrogénase et les acides aminés sont fermentés par un couplage fonctionnel entre cette enzyme et des transaminases.

C O N C L U S I O N S

L'analyse des gaz,recueillis après une culture de 5 jours de 11 bactéries anaérobies et après alcalinisation du milieu en fin de culture, nous a permis de constater la présence de nombreux métabolites, mélangés à l'hydrogène, pour toutes les souches étudiées.

La chromatographie en phase gazeuse nous a conduit à l'identification de 7 de ces substances par la méthode de comparaison des temps de rétention à ceux de substances connues. Nous avons pu trouver les mêmes temps de rétention pour les composés suivants : acétone, méthanol, isopropanol, éthanol, propanol, isobutanol et butanol.

Grâce à la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, nous avons pu préciser l'identification de 5 de ces composés : acétone, éthanol, propanol, isobutanol, butanol, et identifier 3 autres substances : le triméthylamine, l'acétate d'éthyle et le disulfure de diméthyle.

Tous ces métabolites identifiés, soit par chromatographie en phase gazeuse, soit par spectrométrie de masse, ont été retrouvés pour les 11 souches à l'exception de l'isopropanol retrouvé pour 6 souches et du disulfure de diméthyle retrouvé pour 7 souches. Les souches produisant du disulfure de diméthyle produisent également de l'hydrogène sulfuré et du méthane-thiol qui n'ont pas été retrouvés après addition de soude.

Deux métabolites représentés par des pics de faible intensité pour les 11 souches ainsi que deux métabolites pour Clostridium aerofoetidum et un métabolite pour Clostridium fallax et sordellii n'ont pu être identifiés ni par la méthode des temps de rétention, ni par la spectrométrie de masse.

Il faut noter que seuls l'acétone et l'éthanol ont déjà été identifiés pour toutes les souches étudiées. La triméthylamine, l'isopropanol, le disulfure de diméthyle et le butanol ne sont mentionnés que pour certaines souches tandis que les autres métabolites, acétate d'éthyle, méthanol, propanol et isobutanol n'ont pas été retrouvés à notre connaissance par d'autres auteurs parmi les métabolites de ces souches.

Parallèlement à l'identification de ces composés, leur évaluation quantitative a pu être réalisée grâce au respect d'un protocole expérimental identique pour toutes les bactéries.

Cette étude nous aura donc permis,d'une part, d'établir une différenciation de 11 souches de bactéries anaérobies telluriques et, d'autre part, de mettre en évidence, en milieu gazeux, de nombreux métabolites dont certains n'avaient pu être identifiés jusqu'alors.

B I B L I O G R A P H I E

1- ABEL,K., DESCHMERTZING,H. and PETERSON,J.I.

Classification of microorganisms by analysis of chemical composition. Feasibility of utilizing gas chromatography.

J.Bacteriol.,1963,85,1039-1044

2- ALAN JONES,R.

An introduction to gas liquid chromatography

Academic Press, London and New York,1970

3- BALLIO,A., BARCELLONA,S. and SALVATORI,T.

Identification of 9-10-Methylene hexadecanoic acid in some aerobie actinomycetales by a combined gas chromatographic-mass spectroscopic technique.

J.Chromatogr.,1968,35,211-212

4- BASSETTE,R., BAWDON,R.E. and CLAYDON,T.J.

Production of volatile materials in milk by some species of bacteria.

J.Dairy Sci., 1967,50,167-171

5- BASSETTE,R. and CLAYDON,T.J.

Characterization of some bacteria by gas chromatographic analysis of head space vapors from milk cultures.

J.Dairy Sci.,1965,48,775

6- BASSETTE,R., OZERIS,S. and WHITNAH,C.H.

Gas chromatographie analysis of head space gas of dilute aqueous solutions.

Anal.Chem., 1962,34,1540

7- BAWDON,R.E. and BASSETTE,R.

Differentiation of Escherichia coli and Aerobacter aerogenes by gas liquid chromatography.

J.Dairy Sci.,1966,49,624-627

8- BEYNON,J.H.

Mass spectrometry and its applications to organic chemistry.

Elsevier Pub.Cº,Ed.,1960

9- BEYNON,J.H.

Mass and abundance-tables for use in mass spectrometry.

Elsevier Pub.Cº,Ed.,1963

10- BIEMANN,K.

Mass spectrometry.Organic chemistry applications.

Mc Graw-Hill, New York,1962

11- BIENSTOCK,B.

Bacillus putrificus

Ann.Inst.Pasteur,1906,20,407

12- BILLY,C.

Recherches sur les odeurs dégagées par les anaérobies. V- Clostridium sporogenes, souches marines et souches telluriques. Comparaison de leur pouvoir lipidolytique.

Ann.Inst.Pasteur, 1962,103,605

13- BILLY,C.

Recherches sur les odeurs dégagées par les anaérobies. VII- Welchia perfringens et Welchia agni.

Ann.Inst.Pasteur, 1962,103,464

14- BILLY C. et PREVOT,A.R.

Recherches sur les odeurs dégagées par les anaérobies. II- Clostridium corallinum.

Ann.Inst.Pasteur, 1961,100,474

15- BLASS,J., MACHEBOEUF,M. et REBEYROTTE,P.

Application de l'électrophorèse à l'identification de diverses amines biologiques dans les mélanges d'amino-acides.

Bull.Soc.Chim.Biol., 1953,35,953

16- BLASS,J. et SARRAF,A.

Analyse des amines biologiques par les techniques de chromatoionophorèse, électrophorèse et chromatographie sur papier.

J.Chromat., 1960,3,168

17- BOIVIN,M.

Spectromètres de masse.

Chimie analytique, 1949,31,5

18- BOIVIN, M.

Spectrométres de masse.

Chimie analytique, 1949,31,35

19- BOIVIN,M.

Spectromètres de masse.

Chimie analytique, 1949,31,61

20- BOIVIN,M.

Spectromètres de masse

Chimie analytique, 1949,31,80

21- BORY,J., CHAIGNEAU,M. et LABARRE,C.

Etude comparée de la composition des gaz dégagés par Clostridium botulinum types A et B cultivés en milieu au thioglycolate de sodium.

C.R.Acad.Sci.(Paris), 1972,274,472

22- BORY,J. et LABARRE,C.

Etude comparée des gaz dégagés par Clostridium septicum et Clostridium chauvoei cultivés en milieu au thioglycolate de sodium.

Ann.Inst.Pasteur,1969,117,39

23- BORY,J., LABARRE,C., CHAIGNEAU,M. et LE MOAN,G.

Composition des gaz dégagés par Clostridium aerofoetidum et par Clostridium fallax cultivés en milieu au thioglycolate de sodium.

Ann.Pharm.Fr., 1969,27,477

24- BORY,J., LELUAN,G. et BENICHOU,L.

Composition des gaz dégagés par Clostridium septicum, Clostridium chauvoei et Welchia perfringens, cultivés en milieu au thioglycolate de sodium sous vide après alcalinisation du milieu en fin de culture.

C.R.Acad.Sci.(Paris), 1972,274,2382-2384

25- BORY,J., LE MOAN,G., LABARRE,C. et CHAIGNEAU,M.

Etude comparée de la composition des gaz dégagés par Clostridium sordellii et Clostridium bifermentans cultivés en milieu au thioglycolate sous vide.

C.R.Acad.Sci.(Paris), 1969,268,986

26- BROOKS,J.B. and MOORE,W.E.C.

Gas chromatographic analysis of amines and other compounds produced by several species of Clostridium.

Canad.J.Microbiol., 1969,15,1433-1447

27- BROOKS,J.B., MOSS,C.W. and DOWELL,V.R.

Differentiation between Clostridium sordellii and Clostridium bifermentans by gas chromatography.

J.Bacteriol., 1969,100,528-530

28- BRUNNEE,C., JENCKEL,L. u KRONENBERGER,K.

Fortschritte in der anwendung von massenspektrometern als spezifisch anzeigende ionisationsdetektoren für die gaschromatographie.

Z.anal.Chem., 1963,197,42

29- CHAIGNEAU,M., BORY,J., LE MOAN,G. et LABARRE,C.

Composition des gaz dégagés par Clostridium septicum cultivé en milieu au thioglycolate.

C.R.Acad.Sci. (Paris), 1965,261,2403

30- CHAUVEAU,A.et ARLOING,S.

Etude expérimentale sur la septicémie gangréneuse.

Bull.Acad.Med., 1884, 2ème série, 13, Séances du 3 juin et du 19 août. 715 et 1129

31- CHERRY,W.B. and MOSS,C.W.

The role of gas chromatography in the clinical microbiology laboratory

J.Infect.Dis., 1969,119,658 - 662

32- Commissariat à l'Energie Atomique

Spectrométrie de masse en chimie analytique.

Dunod, Paris, 1969

33- CORNU,A. et MASSOT,R.

Index de spectres de masse.

Presses Universitaires de France, 1966

34- DOELLE,H.W.

Preparation of extracts of culture liquid for gas chromatography. Determination of non-acidic fermentation products.

Antonie Van Leeuwenhoek, 1966,32,373-380

35- DUCLAUX,E.

Sur les odeurs de putréfaction

Ann.Inst.Pasteur, 1896,10,59

36- FARSHTCHI,D. and MOSS,C.W.

Characterization of bacteria by gas chromatography : comparison of trimethylsilyl derivatives of whole cell hydrolysates.

Appl.Microbiol., 1969,17,262-267

37- FONTANGES,R., BLANDENET,G. et QUEIGNEC,R.

Difficultés d'application de la chromatographie en phase gazeuse à l'identification des bactéries.

Ann.Inst.Pasteur, 1967,112,10-23

38- GARNER,W. and GENNARO,R.M.

Related bacteria differentiated by gas chromatography.

Chem.Eng.News., 1965,43,69

39- GOLOVNYA,R.V., ZHURAVLEVA,I.L. and KHARATYAN,S.G.

Gas chromatographic analysis of amines in volatile substances of Streptococcus lactis.

J.Chromatog., 1969,44,262-268

40- GOLOVNYA,R.V., MIRONOV,G.A. and ZHURAVLEVA,I.L.

Gas chromatographic analysis isoaliphatic amines and heterocyclic nitrogen-containing compounds.

Zh.Analit.Khim., 1967,22,797-801

41- GOLOVNYA,R.V., MIRONOV,G.A. and ZHURAVLEVA,I.L.

A method for the identification of n-Alkylamines by gas chromatography without the use of a standard.

Dokl.Akad.Nauk., USSR, 1965,163,369-371

42- GUERIN, H.

Traité de manipulation et d'analyse des gaz.

Masson et Cie, Paris, 1952

43- GUGGENHEIM,M.

Les amines biologiques.

Edition française de BERTHELOT,A., PREVOT,A.R. et KARL,C. Baillière, 1933

44- HEINS,J.Th., MAARSE,H., TEN NOEVER de BRAUW,M.C. and WEURMEN,C.

Direct food vapeur analysis and composent identification by a coupled capillary GLC-MS arrangement.

J.Gaschromatog.,1966,4,395

45- HENIS,Y. and ALEXANDER,M.

Differentiation of Streptomyces strains by gas chromatography.

Antonie Van Leeuwenhoek, 1968,34,159-164

46- HENIS,Y., GOULD,J.R. and ALEXANDER,M.

Detection and identification of bacteria by gas chromatography.

Appl.Microb., 1966,14,513-524

47- HENNEBERG,D. u.SCHONBURG,G.

Die kombinierte anwendung von gaschromatographie und massenspektrometer.

Z.Anal.Chem., 1965,211,55

48- KAHN,M.C.

Hydrogen sulphide production by anaerobie spore-bearing bacteria.

J.Bact., 1925,10,439

49- KANEDA, T.

Fatty acids in the genus Bacillus. I- Iso and ante iso fatty acid as characteristic constituents of lipids in 10 species.

J.Bact.,1967,93,894-903

50- KÁNEDA,T.

Fatty acids in the genus Bacillus - II- Similarity in the fatty acid compositions of Bacillus thuringiensis, Bacillus anthracis and Bacillus cereus.

J.Bact.,1968,95,2210-2216

51- KEPNER,R.E., MAARSE,H. and STRATING,J.

Gas chromatography head space techniques for the quantitative determination of volatile components in multicomponent aqueous solutions.

Anal.Chem., 1964,36,77

52- KISELEV,A.V. et YASHIN,Y.J.

La chromatographie gaz-solide.

Masson, Paris, 1969

53- LABARRE,C.

Etude des gaz produits par les bactéries anaérobies telluriques agents de gangrènes gazeuses cultivées en milieu au thioglycolate de sodium.

Thèse Doct.Etat, Pharmacie (Paris), 1968

46- HENIS,Y., GOULD,J.R. and ALEXANDER,M.

Detection and identification of bacteria by gas chromatography.

Appl.Microb., 1966,14,513-524

47- HENNEBERG,D. u.SCHONBURG,G.

Die kombinierte anwendung von gaschromatographie und massenspektrometer.

Z.Anal.Chem., 1965,211,55

48- KAHN,M.C.

Hydrogen sulphide production by anaerobie spore-bearing bacteria.

J.Bact., 1925,10,439

49- KANEDA, T.

Fatty acids in the genus Bacillus. I- Iso and ante iso fatty acid as characteristic constituents of lipids in 10 species.

J.Bact.,1967,93,894-903

50- KANEDA,T.

Fatty acids in the genus Bacillus - II- Similarity in the fatty acid compositions of Bacillus thuringiensis, Bacillus anthracis and Bacillus cereus.

J.Bact.,1968,95,2210-2216

51- KEPNER,R.E., MAARSE,H. and STRATING,J.

Gas chromatography head space techniques for the quantitative determination of volatile components in multicomponent aqueous solutions.

Anal.Chem., 1964,36,77

52- KISELEV,A.V. et YASHIN,Y.J.

La chromatographie gaz-solide.

Masson, Paris, 1969

53- LABARRE,C.

Etude des gaz produits par les bactéries anaérobies telluriques agents de gangrènes gazeuses cultivées en milieu au thioglycolate de sodium.

Thèse Doct.Etat, Pharmacie (Paris), 1968

46- HENIS,Y., GOULD,J.R. and ALEXANDER,M.

Detection and identification of bacteria by gas chromatography.

Appl.Microb., 1966,14,513-524

47- HENNEBERG,D. u.SCHONBURG,G.

Die kombinierte anwendung von gaschromatographie und massenspektrometer.

Z.Anal.Chem., 1965,211,55

48- KAHN,M.C.

Hydrogen sulphide production by anaerobie spore-bearing bacteria.

J.Bact., 1925,10,439

49- KANEDA, T.

Fatty acids in the genus Bacillus. I- Iso and ante iso fatty acid as characteristic constituents of lipids in 10 species.

J.Bact.,1967,93,894-903

50- KÁNEDA,T.

Fatty acids in the genus Bacillus - II- Similarity in the fatty acid compositions of Bacillus thuringiensis, Bacillus anthracis and Bacillus cereus.

J.Bact.,1968,95,2210-2216

51- KEPNER,R.E., MAARSE,H. and STRATING,J.

Gas chromatography head space techniques for the quantitative determination of volatile components in multicomponent aqueous solutions.

Anal.Chem., 1964,36,77

52- KISELEV,A.V. et YASHIN,Y.J.

La chromatographie gaz-solide.

Masson, Paris, 1969

53- LABARRE,C.

Etude des gaz produits par les bactéries anaérobies telluriques agents de gangrènes gazeuses cultivées en milieu au thioglycolate de sodium.

Thèse Doct.Etat, Pharmacie (Paris), 1968

54- LABARRE,C. et BORY J.

Etude des gaz dégagés par Clostridium oedematiens cultivé en milieu au thioglycolate de sodium sous vide.

Ann.Inst.Pasteur, Paris, 1969,117,222

55- LABARRE,C. et BORY,J.

Comparaison des résultats obtenus concernant l'étude des gaz dégagés par 11 bacilles anaérobies des gangrènes gazeuses, cultivés en milieu au thioglycolate de sodium, sous vide.

Ann.Inst.Pasteur, Paris, 1969,117,364

56- LABARRE,C., CHAIGNEAU,M. et BORY,J.

Composition des gaz dégagés par Plectridium tetani cultivé en milieu au thioglycolate.

C.R.Acad.Sci.(Paris), 1972,274,2545-2548

57- LABARRE,C., CHAIGNEAU,M., BORY,J. et LE MOAN,G.

Composition des gaz dégagés par Clostridium sporogenes et par Clostridium septicum cultivés en milieu au thioglycolate.

C.R.Acad.Sci. (Paris), 1966,262,2550

58- LABARRE,C., CHAIGNEAU,M., LE MOAN,G. et BORY, J.

Composition des gaz dégagés par Welchia perfringens et par Plectridium putrificum cultivés en milieu au thioglycolate de sodium.

Ann.Pharm.Fr., 1969,27,261

59- LE MOAN,G., LABARRE,C., CHAIGNEAU,M. et BORY,J.

Composition des gaz dégagés par Clostridium histolyticum cultivé en milieu au thioglycolate.

C.R.Acad.Sci. (Paris), 1966,263,1906

60- LE MOAN,G., VALDENER,G. et CHAIGNEAU,M.

Spectrométrie de masse de haute résolution : principes, appareils, applications.

Chimie et industrie, 1966,95,162

61- LEWIS,V.J., MOSS,C.W. and JONES,W.L.

Determination of volatile acid production of Clostridium by gas chromatography.

62- LEWIS,V.J., WEAVER,R.E. and HOLLIS,D.G.

Fatty acid composition of Neisseria species as determined by gas chromatography.

J.Bact., 1968,96,1-5

63- LLEWLLYN,P.M.

Dual-stage-membrane gas separators with variable conductance means for varying their throughput.

Résumé in Chemical Abstracts, 1969,70,12884z

64- Mc FADDEN,W.H., TERANISHI,R., CORSE,J., BLACK,D.R. and MON,T.R.

Combined mass spectrometry and gas chromatography on complex mixtures

J.Chromatog., 1965,18,10

65- Mc LAFFERTY,F.W.

Mass spectrometry of organic ions.

Academic Press, New York et Londres, 1963

66- METCHNIKOFF,E.

Etude sur la flore intestinale.

Ann.Inst.Pasteur,Paris, 1908,22,929

67- MITRUKA,B.M. and ALEXANDER,M.

Ultra sensitive detection of certain microbial metabolites.

Anal.Biochem.,1967,20,548-550

68- MITRUKA,B.M. and ALEXANDER,M.

Rapid and sensitive detection of bacteria by gas chromatography.

Appl.Microbiol., 1968,16,636-640

69- MOORE,W.E.C., CATO,E.P. and HOLDEMAN,L.V.

Fermentation patterns of some Clostridium species.

Int.J.Syst.Bacteriol., 1966,16,383-415

70- MOSS,C.W. and LEWIS,V.J.

Characterization of Clostridia by gas chromatography. I- Differentiation of species by cellular fatty acid.

Appl.Microbiol., 1967,15,390-397

71- MOSS,C.W., DOWELL,V.R., FARSHTCHI,D., RAINES,L.J. and CHERRY,W.B.

Cultural characteristics and fatty acid composition of propionibacteria.

J.Bact., 1969,97,561-570

72- MYERS,J.T.

The production of hydrogen sulphide by bacteria.

J.Bact., 1920,5,231

73- NEISH, A.C.

Analytical methods for bacterial fermentation.

Nat.Res.Council.of Canada, Report,1952,46,3

74- Ó'BRIEN,R.T.

Differentiation of bacteria by gas chromatographic analysis of products of glucose catabolism.

Food Technol., 1967 ,21,1130-1132

75- OYAMA,V.I. and CARLE,G.C.

Pyrolysis gas chromatography application of life detection and chemotaxonomy.

J.Gas Chromatogr., 1967,5,151-154

76- PASTEUR,L.

Vibrion septique et septicémie.

Bull.Acad.Med., 1881,2ème série,10,Séance du 8 février, 176

77- PASTEUR,L. et JOUBERT

Charbon et septicémie.

Bull.Acad.Med., 1877,2ème série,6,781

78- PLAT,M.

Utilisation de la spectrométrie de masse en chimie structurale.
Bull.Soc.Chim.de France, 1964,2361-2372

79- PREVOT,A.R.

Biologie des maladies dûes aux anaérobies.
Editions médicales, Flammarion, Paris, 1955

80- PREVOT,A.R.

Manuel de classification et de détermination des anaérobies.
3ème édition, Masson et Cie, 1957

81- PREVOT,A.R.

Traité de systématique bactérienne.
Dunod, Paris,1961

82- PREVOT,A.R.

Techniques pour le diagnostic des bactéries anaérobies.
Ed.de la Tourelle, Paris, 1966

83- PREVOT,A.R. et CORDIER,P.

Recherches biochimiques comparées sur Clostridium bifermentans, Clostridium sordellii et Clostridium aerofoetidum.
Ann.Inst.Pasteur, 1941,67,473

84- PREVOT,A.R. et SARRAF,A.

Recherches sur les odeurs dégagées par les anaérobies. I- Inflabilis lacustris.
Ann.Inst.Pasteur, 1960,99,629

85- PREVOT,A.R. et THOUVENOT,H.

Recherches sur les odeurs dégagées par les anaérobies. VIII- Clostridium botulinum et Clostridium sordellii.
Ann.Inst.Pasteur, 1962,103,925

86- PREVOT,A.R., TURPIN,A. et KAYSER,P.

Les microbes anaérobies.

Dunod, Paris, 1967

87- REINER,E.

Studies on differentiation of microorganisms by pyrolysis-gas-liquid chromatography.

J.Gas Chromatogr., 1967,5,65-67

88- REINER,E. and EWING,W.H.

Chemotaxonomic studies of some gram negative bacteria by means of pyrolysis-gas-liquid chromatography.

Nature (London), 1968,217,191-194

89- REINER,E. and KUBICA,G.P.

Predictive value of pyrolysis-gas-liquid chromatography in the differentiation of mycobacteria.

Amer.Rev.Resp.Dis., 1969,99,42-49

90- RENAULT

Gangrène traumatique. Mémoire et observations cliniques sur une de ses causes les plus fréquentes dans les animaux domestiques.

1840, in WEINBERG,M. et SEGUIN,P. , La gangrène gazeuse, Masson et Cie, Paris,1918.

91- RYHAGE,R.

Use of a mass spectrometer as a detector and analyzer for effluents emerging from high temperature gas liquid chromatography columns.

Anal.Chem., 1964,36,759

92- SARRAF,A.

Recherches sur les amines de décarboxylation produites par une bactérie anaérobie : Inflabilis lacustris.

Thèse Doct.Univ.Pharmacie, Paris, 1960

93- SENEZ,J.

Microbiologie générale.

Doin, Deren et Cº, Paris, 1968

94- SHILMAN,A. and SCHAPER,L.W.

The analysis of small concentrations of biacetyl.

J.Gas Chromatogr., 1966,4,486

95- TEN NOEVER de BRAUW,M.C. u.BRUNNEE,C.

Ergebnisse mit einer optimierten kopplung von gas-chromatograph und massenspektrometer.

Z.Anal.Chem., 1967,229,321

96- TERANISHI,R., BUTTERY,R.G., Mc FADDEN,W.H., MON,T.R. and WASSERMAN,J.

Capillary column efficiencies in gas chromatography-mass spectral analysis.

Anal.Chem., 1964,36,1509

97- TISSIER,H. et MARTELLY

Recherches sur la putréfaction de la viande de boucherie.

Ann.Inst.Pasteur, Paris, 1902,16,865

98- TOÁN,T.T., BASSETTE,R. and CLAYDON,T.J.

Methyl sulfide production by Aerobacter aerogenes in milk.

J.Dairy Sci., 1965,48,1174

99- TRANCHANT,J.

Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse.

Masson et Cie, Paris, 1968

100- TURNER,R. et GUILMOUR,M.

Gas chromatography as an aid in fermentation studies.

Anal.Biochem., 1965,13,552-582

101- VEILLON et ZUBER

Recherches sur quelques microbes strictement anaérobies et leur rôle en pathologie.

Arch.Med.exp., 1898,10,517

102- VOLLMIN, J.A , OMARA,I., SEIBI,J., GROB,K. u.SIMON,W.

Einsatz gas-chromatographischer kolonnen hoher trennleistung in direkter kombination mit massenspektrometer.

Helv.Chim.Acta., 1966,49,1768

103- WATSON,J.T. and BIEMANN,K.

High resolution mass spectra of compounds emerging from a gas chromatograph.

Anal.Chem., 1964,36,1135

104- WATSON,J.T. and BIEMANN,K.

Direct recording of high resolution mass spectra of gas chromatographic effluents.

Anal.Chem., 1965,37,844

105- WEINBERG,M., NATIVELLE,R. et PREVOT,A.R.

Les microbes anaérobies.

Masson et Cie, Paris, 1937

106- WEINBERG,M. et SEGUIN,P.

Le Bacillus oedematiens et la gangrène gazeuse.

C.R.Soc.Biol., 1915,78,507

107- WEINBERG,M. et SEGUIN,P.

Flore microbienne de la gangrène gazeuse. Le Bacillus fallax.

C.R.Soc.Biol., 1915, 161, 744

108- WEINBERG,M. et SEGUIN,P.

La gangrène gazeuse.

Masson et Cie, Paris, 1918

109- WELCH,W.H. and NUTTALL,G.H.F.

A gas producing bacillus (Bacillus aerogenes capsulatus, nov.spec.) capable of rapid development in the blood vessels after death.

Bull.of the John's Hopkins Hospital, 1892,3,81

110- WOLF,C.G.L.

Contributions to the biochemistry of pathogenic anaerobes . IX- The biochemistry of Bacillus oedematiens.

J.Path.Bact., 1919,23,254

111- WOLF,C.G.L. and HARRIS,J.E.G.

Contributions to the biochemistry of pathogenic anaerobes .
I- The biochemistry of Bacillus welchii and Bacillus sporogenes.

J.Path.Bact., 1917, 21,386

112- WOLF,C.G.L. and HARRIS,J.E.G.

Contributions to the biochemistry of pathogenic anaerobes . IV- The biochemistry of Bacillus histolyticus.

J.Path.Bact., 1918,22,1

113- WOOD, W.A.

The Bacteria.

Acad.Press, 1961,2,82

114- YAMAKAWA,T. and UETA,N.

Gas chromatographic studies of microbial components. I- Carbohydrate and fatty acids constitution of Neisseria.

Jap.J.Exp.Med., 1964,34,361-374

115- YOSHIOKA,M., KITAMURA,M. and TAMURA,Z.

Rapid gas chromatographic analysis of microbial volatile metabolites.

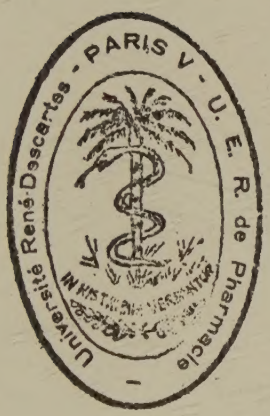
Jap.J.Microbiol., 1969,13,87-93

Vu et permis d'imprimer

Paris le 15 Mai 1973

Le Vice-Président de

l'Université Paris V



G. DILLEMANN